

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von Dr. med. vet. Katja Nuss

Zelluläre Antwort auf die Implantation degradierbarer Knochenersatzmaterialien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Simone A. Reindl

Tierärztin
aus Bruchsal, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. em. Dr. med. vet. Hans Geyer, Korreferent

Zürich 2012

Departement für Pferde
der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich
Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst, Dipl. ECVS

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)
Leiterin: Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Dipl. ECVS

Arbeit unter wissenschaftlicher Betreuung von Dr. med. vet. Katja Nuss

Zelluläre Antwort auf die Implantation degradierbarer Knochenersatzmaterialien

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der
Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

vorgelegt von

Simone A. Reindl

Tierärztin
aus Bruchsal, Deutschland

genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin
Prof. em. Dr. med. vet. Hans Geyer, Korreferent

Zürich 2012

Meiner Familie
in Liebe und Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
Summary	5
1 Einleitung	6
2 Literaturübersicht	7
2.1 Transplantate und Implantate	7
2.2 Knochenersatzmaterialien	8
2.2.1 Charakterisierung der in der vorliegenden Studie verwendeten	9
Knochenersatzmaterialien	9
2.2.1.1 Hydrogele	10
2.2.1.2 Kalziumphosphat-Verbindungen	11
2.2.1.3 Kalziumsulfat-hemihydrat (CSH, $(\text{CaSO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$, „Plaster of Paris“)	14
2.2.1.4 Seide	15
2.3 Tiermodelle zur Erprobung von Knochenersatzmaterialien	16
2.3.1 Auswahl der Versuchstiere	16
2.3.2 Auswahl des Versuchsmodells	17
2.4 Biodegradation und Resorption von Implantaten	18
2.4.1 Vor- und Nachteile biodegradierbarer Implantate	18
2.4.2 Wege der Biodegradation von Knochenersatzmaterialien	20
2.4.2.1 Herkunft der Phagozyten	21
2.4.2.2 Bedeutung der Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen und Osteoklasten bei der Resorption von Knochenersatzmaterialien	21
2.5 Immunantwort auf Implantate und deren Biokompatibilität	23
2.5.1 Immunantwort auf Implantate	23
2.5.2 Biokompatibilität von Implantaten	25
3 Material und Methoden	27
3.1 Versuchstiere	27
3.1.1 Präoperative Versorgung der Tiere	27
3.1.2 Operationen	28
3.1.2.1 Vorbereitung und Prämedikation	28
3.1.2.2 Narkose	28
3.1.2.3 Operationsdurchführung	29
3.1.3 Postoperative Versorgung der Tiere	31
3.2 Verwendete Knochenersatzmaterialien	32
3.2.1 Hydrogele	32
3.2.2 Kalzium-Phosphat Verbindungen	32
3.2.2.1 Brushite-Zement	33

3.2.2.2 Brushite-Zement „X-9“	33
3.2.2.3 chronOS TM - Inject.....	33
3.2.2.4 Norian Reinforced®	33
3.2.2.5 Biobon®	34
3.2.2.6 Kalziumsulfathemihydrat (CSH).....	34
3.2.2.7 Blöcke aus β - Tricalciumphosphat (β - TCP)	34
3.2.3 Seide.....	34
3.3 Gewinnung der Proben	35
3.4 Aufbereitung der Proben für die histologische Untersuchung	35
3.4.1 Herstellung der Dickschnittpräparate	36
3.4.2 Herstellung der Dünnschnittpräparate	37
3.4.3 Toluidinblau-Färbung	37
3.4.4 Von Kossa-Färbung mit McNeal Tetrachrom Gegenfärbung.....	38
3.5 Beurteilung der histologischen Präparate.....	38
3.5.1 Lichtmikroskopische Charakterisierung der quantitativ ausgewerteten Zelltypen in der Toluidinblau- Färbung	40
3.5.1.1 Makrophagen.....	40
3.5.1.2 Mehrkernige Riesenzellen	40
3.5.1.3 Lymphozyten	41
3.5.1.4 Plasmazellen.....	41
3.5.1.5 Fibroblasten und Fibrozyten.....	41
3.6 Statistische Auswertung.....	42
4 Resultate.....	43
4.1 Operationsdurchführung und postoperative Phase.....	43
4.2 Probengewinnung und – aufbereitung	44
4.3 Histologische Beurteilung der Präparate	44
4.3.1 Hydrogele	44
4.3.1.1 Hydrogele auf der Basis von Fibrin (Schaf Nr. 2404 – 2409).....	44
4.3.1.2 Hydrogele auf der Basis von Fibrin und Polyethylenglykol, teilweise mit Zusätzen (Schaf Nr. 1204 - 1209)	46
4.3.1.3 Zusammenfassung der Zellverteilung beim Einsatz von Hydrogelen.....	47
4.3.2 Kalziumphosphat-Verbindungen	48
4.3.2.1 Kalziumphosphat verschiedener Porengröße (Schaf Nr. 864 – 866).....	48
4.3.2.2 Kalziumphosphat: verschiedene Zemente (Schaf Nr. 2501 – 2503)	49
4.3.2.3 Kalziumphosphat-Zemente (Schaf Nr. 804, 806)	49
4.3.2.4 Kalziumphosphat-Zemente (Schaf Nr. 839, 842)	50
4.3.2.5 Zusammenfassung der Zellverteilung beim Einsatz von Kalziumphosphat- Verbindungen	51
4.3.3 Seide.....	52
4.3.3.1 Seiden verschiedener Porengröße (Schaf Nr. 3101 – 3103).....	52
4.3.3.2 Zusammenfassung der Zellverteilung beim Einsatz von Seiden	53
4.3.4 Leerkontrollen	54
4.4 Statistische Auswertung.....	54

5 Diskussion	55
5.1 Ziel der Studie.....	55
5.2 Wahl eines geeigneten Versuchsmodells	55
5.2.1 Tiermodell	55
5.2.2 Versuchsmodell.....	56
5.1.3 Operationsdurchführung.....	57
5.2 Eingesetzte Knochenersatzmaterialien	58
5.2.1 Hydrogele	58
5.2.2 Kalziumphosphat-Verbindungen	59
5.2.3 Seide.....	60
5.2.4 Leerkontrollen	61
5.3 Probengewinnung, -aufbereitung und -auswertung	62
5.4 Histologische Beurteilung der Präparate.....	63
5.4.1 Identifizierung der Zellen	63
5.4.2 Beurteilung der Immunreaktion auf die Implantation von	64
Knochenersatzmaterialien.....	64
5.4.2.1 Beurteilung der Makrophagen.....	64
5.4.2.2 Beurteilung der mehrkernigen Riesenzellen.....	65
5.4.2.3 Beurteilung der Lymphozyten und Plasmazellen	67
6 Schlussfolgerung.....	68
7 Ausblick.....	69
8 Literaturverzeichnis.....	70
9 Abkürzungsverzeichnis.....	78
10 Annex.....	79
10.1.Tabellen	79
10.2. Graphische Darstellung der Resultate	95
10.3. Abbildungen.....	101
Danksagung	108
Lebenslauf.....

Zusammenfassung

Es wurden 33 degradierbare Knochenersatzmaterialien in Schafknochen implantiert und auf ihre zelluläre Reaktion untersucht. Es wurden Kalziumphosphat-Verbindungen, Kalziumsulfat, Hydrogelpräparate und Seidenmatrices eingesetzt und die Verteilung der Lymphozyten, Plasmazellen, mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen in vier Zonen des Bohrlochdefektes 6 - 8 Wochen post operationem histologisch untersucht und quantitativ beurteilt. Alle implantierten Materialien waren zuvor in anderen Studien als biokompatibel beurteilt worden.

Der Abbau der Knochenersatzmaterialien erfolgte von peripher nach zentral, dabei entstand eine materialspezifische Verteilung der Zellen. Bei Kalziumphosphatzementen waren dies überwiegend Makrophagen, bei einzelnen Hydrogel- und den Seidenpräparaten fanden sich auch zahlreiche mehrkernige Riesenzellen. Aussehen und Größe der Phagozyten wurde durch das eingesetzte Fremdmaterial bestimmt. Beim Abbau großmolekularer Materialien wie Seiden und Hydrogele wurden mehrkernige Riesenzellen erwartet. Knochenneubildung wurde in unmittelbarer Nachbarschaft zu mehrkernigen Riesenzellen nachgewiesen.

Beim Einsatz von Seidenmatrices kam es teilweise zur Bildung eines Bindegewebesaumes um Materialreste, was für eine herabgesetzten Verträglichkeit sprach.

Die beim Abbau der verschiedenen Materialien regelmäßig vorkommenden Riesenzellen sind nach den vorliegenden Erfahrungen Zeichen eines normalen Abbaus und nicht einer herabgesetzten Biokompatibilität.

Summary

The aim of this study was to histologically evaluate the cellular reaction to 33 degradable bone substitute materials implanted in a drill hole model in sheep. The different materials were based on calciumphosphate cement, calciumsulfate, hydrogel and silk and had already been classified as biocompatible in earlier studies. The histological evaluation took place 6 – 8 weeks post operationem and lymphocytes, plasma cells, macrophages and multinucleated foreign body cells (MFBC) were quantified in four different zones of the drill hole. The degradation from peripheral to central led to a specific pattern of cells. Calciumphosphate cements were mainly degraded by macrophages, while many MFBC were found in silk-based and some of the hydrogel-based materials. Shape and size of the phagocytes were determined by the degraded material. In the disintegration process of large-molecular materials based on silk or hydrogel, MFBC were expected, but did not interfere with the biocompatibility. The formation of new bone was detected right next to MFBC.

The rest of some silk-based materials were encircled by fibrous tissue, which may be connected to a lower biocompatibility.

According to the available results, this research confirms that the MFBC which were regularly encountered in the degradation of various materials are part of a normal disintegration process and not a sign of a reduced biocompatibility.

1 Einleitung

Knochenersatzmaterialien werden in der Chirurgie regelmäßig angewendet, wenn autologe Transplantate nicht, oder nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung stehen. In den letzten Jahrzehnten wurden eine Vielzahl von Kalzium-Phosphat-Verbindungen erfolgreich klinisch angewendet, des Weiteren gelangen zunehmend Produkte auf Hydrogel-Basis zum Einsatz, die Vorteile in der mechanischen Belastbarkeit und Resorptionsgeschwindigkeit vereinen. Während Nahtmaterialien auf Seidenbasis seit vielen Jahren Verwendung finden, ist dagegen die Verarbeitung von Seidenmatrices als Knochenersatz noch in der Entwicklung.

An alle Knochenersatzmaterialien werden hohe Anforderungen gestellt, denn nur eine ausgezeichnete Biokompatibilität ermöglicht einen physiologischen Heilungsprozess, in dessen Verlauf die Fremdsubstanz abgebaut und durch neuen Knochen ersetzt wird.

In der vorliegenden Studie wurden 33 verschiedene Knochenersatzmaterialien auf der Basis von Hydrogelen, Kalzium-Phosphatverbindungen, Kalziumsulfat und Seide untersucht, die in anderen Studien bereits Verwendung fanden und in deren Gegenwart in einem Zeitraum von 3 bis 6 Monaten Knochenzuwachsrate von 10-70 % nachgewiesen wurden.

Ziel dieser Arbeit war die Beurteilung der zell- mediierten Resorptionsvorgänge bei verschiedenen Knochenersatzmaterialien im Bohrloch-Modell beim Schaf. Es wurde zur Beurteilung der Biokompatibilität die Anzahl und Verteilung mehrkerniger Riesenzellen, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen ermittelt. Zusätzlich wurde das Vorliegen einer kapselartigen Bindegewebsstruktur als Zeichen einer verminderten Heilungstendenz des Knochens erfasst.

Dabei sollten die Ergebnisse die Hypothese stützen, dass das Vorkommen phagozytierender Zellen wie Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen ein Charakteristikum des Abbauprozesses großmolekularer degradierbarer Knochenersatzmaterialien ist und somit mit einer materialabhängigen Anzahl dieser resorbierenden Zellen zu rechnen ist, ohne dass es zu einem gestörten Heilungsverlauf kommt.

2 Literaturübersicht

2.1 Transplantate und Implantate

Transplantate (von lateinisch *transplantatus* = verpflanzt) sind Organe oder Gewebe, die zu therapeutischen Zwecken innerhalb eines Organismus, oder von einem auf ein anderes Individuum übertragen werden¹. Darunter fallen Organtransplantate wie Leber, Niere, Herz und Lunge, aber auch Gewebstransplantate, wie Linsen, Menisken, Knochenmark oder Spongiosa. Indikationen für eine Transplantation sind krankhafte Prozesse, die Gewebe bzw. Organe so schädigen, dass sie ihre Funktion nicht mehr ausreichend erfüllen können. Im Allgemeinen werden Transplantate aus allogenen Spendern entnommen und dem Empfänger transplantiert. Ausnahmen sind die Eigenblutspende und die Gewinnung von autogener Spongiosa. Die Auswahl des Spenders ist durch die hohe Immunogenität von Fremdgewebe schwierig. Außerdem besteht die Gefahr der Übertragung von Krankheiten zwischen den Individuen. Da die Anzahl von Spendern bei weitem nicht dem Bedarf entspricht, werden zum Teil xenogene Transplantate verwendet, etwa Herzklappen aus Schweineherzen für Menschen.

Die Entwicklung von Alternativen in Form von synthetischen, biokompatiblen Implantaten ist deshalb ein immer wichtiger werdender Forschungsbereich.

Als **Implantate** (von lateinisch *implantatus* = eingepflanzt) werden zusammenfassend künstliche Stoffe und Teile bezeichnet, die zur Erfüllung bestimmter Funktionen für einen begrenzten Zeitraum oder auf Lebenszeit in einen Organismus eingebracht werden¹. Hierunter fallen unter anderem Nahtmaterialien, künstliche Herzklappen, Stents, Linsen, Zahnprothesen, künstliche Menisken und Ligamente², Netze zur Hernienreposition, Osteosyntheseplatten, -schrauben, -drähte und Totalendoprothesen, Knochenersatzmaterialien, aber auch medizinische Geräte wie Herzschrittmacher und Insulinpumpen. Manche dieser Implantate werden aus resorbierbaren Materialien hergestellt und vom Körper abgebaut, nachdem sie ihre zeitlich begrenzte Ersatzfunktion ausgeführt haben.

Für alle Implantate gilt, dass sie über eine hohe Biokompatibilität verfügen müssen, d.h. sie dürfen keine Entzündungsreaktion hervorrufen und nicht toxisch sein. Bei resorbierbaren Materialien müssen deren Abbauprodukte metabolisierbar sein³.

Bei der Beurteilung der Biokompatibilität wird insbesondere auf mögliche Zytotoxizität, Karzinogenität, Hypersensitivität und auf die Inzidenz von Infektionen geachtet⁴. Die

Biokompatibilität ist dabei von einer Vielzahl von Faktoren abhängig, u. a. der chemischen und topographischen Oberfläche des Implantates, der elektrischen Ladung, der Freisetzung von Partikeln und der Abbaubarkeit durch Lösung und / oder phagozytäre Mechanismen⁵. Außerdem bestimmen auch individuelle Faktoren das Ausmaß der relativen Biokompatibilität⁵.

2.2 Knochenersatzmaterialien

Knochendefekte entstehen unter anderem durch aseptische Nekrose infolge von Durchblutungsstörungen, Verletzungen, Chemikalien oder durch Strahlentherapie mit Radium bei der Behandlung maligner Tumore⁶.

Die Knochenheilung stellt eine besondere Herausforderung für den Körper dar, weil kein narbiges Ersatzgewebe, sondern ein voll funktionsfähiges Gewebe entsteht, welches dem ursprünglichen Gewebe anatomisch sehr ähnlich ist^{7,8}. Dies gelingt dem Körper jedoch nur bei Defekten bis zu einer gewissen Größe. Bei sog. „critical size defects“ kommt es nicht mehr zur Spontanheilung, sondern zur Ausbildung eines bindegewebigen Ersatzgewebes mit weniger als 10% Knochenneubildung innerhalb eines Jahres⁹. Durch Transplantate und / oder Implantate wird die natürliche Knochenheilung unterstützt, so dass Stabilität und Funktion des chirurgisch versorgten Knochens den physiologischen Verhältnissen entsprechend (schneller) wieder hergestellt werden.

Seit über 100 Jahren werden Knochentransplantate zur Rekonstruktion oder als Ersatz bei Knochendefekten in Orthopädie und Mund- Kiefer-Gesichtschirurgie eingesetzt¹⁰.

Autologe Spongiosa-Transplantate gelten aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften als Mittel der Wahl bei der Behandlung von Knochendefekten nach Frakturen, Knocheninfektionen oder –tumoren, bei der Kallusdistraction, sowie bei der Versorgung von Pseudarthrosen und bei Arthrodesen^{10,11,12,13,14}. Autologe Spongiosa gilt als osteogenetisch, osteoinduktiv und osteokonduktiv^{10,15,16} und verfügt über eine ausgezeichnete Biokompatibilität¹³. Obwohl durch den Gewinnungs- und Verarbeitungsprozess zahlreiche Zellen zugrunde gehen, führen die überlebenden Zellen zu einer rascheren Knochenheilung¹⁵. Weitere Vorteile bestehen in der Histokompatibilität und dem Ausschluss einer möglichen Krankheitsübertragung¹⁰. Der Abbau des Transplantates erfolgt durch Osteoklasten, zeitgleich erfolgt die Auflagerung neuer Knochenmatrix auf den nekrotischen Knochenoberflächen, so

dass ein „schleichender Ersatz“ erfolgt¹⁴. Die Spongiosaentnahme ist allerdings für den Patienten mit einigen Nachteilen verbunden, wie längere Operations- und damit Narkosedauer, postoperative Komplikationen wie Schmerzen, Sensibilitätsverluste, Infektionen, Hämatome und sogar Frakturen^{11,12,14,17}. Weitere Nachteile sind die nur begrenzt zur Verfügung stehende Menge und die fehlende mechanische Stabilität des Transplantates¹⁰. Zur Vermeidung dieser Komplikationen wird allo- oder xenogene Spongiosa transplantiert, jedoch erfordert deren Immunogenität eine vorhergehende Bearbeitung (Gefrieren, Gefriertrocknen, Entfetten, Deproteinieren etc.¹²), bei der die osteogenetischen Zellen (Osteoprogenitorzellen, Osteoblasten) und osteoinduktiven Proteine (Bone Morphogenetic Protein, BMP) zerstört werden^{10,13}. Vor dem Einlagern von Knochen in Knochenbanken müssen potentiell übertragbare Infektionskrankheiten, insbesondere AIDS, Hepatitis und Kreutzfeld-Jakob-Krankheit, sicher ausgeschlossen werden^{10,12}.

Die erwähnten Risiken und Nachteile von Knochentransplantaten führten zur Entwicklung sog. **Knochenersatzmaterialien**. Dabei werden als Knochenersatzmaterialien von Muschler und Lane¹⁸ solche implantierten Materialien bezeichnet, die alleine oder in Kombination mit anderen Materialien die Knochenheilung beschleunigen, in dem sie lokal osteogenetisch, osteokonduktiv oder osteoinduktiv wirken. In einem als osteogenetisch bezeichneten Material lassen sich lebende Zellen nachweisen, die das Potential besitzen, Knochen zu bilden¹⁵. Man bezeichnet Knochenersatzmaterialien als osteokonduktiv, wenn sie zu Knochenablagerung auf ihrer Oberfläche führen und als osteoinduktiv, wenn sie einen biologischen Stimulus zur Differenzierung von Osteoblasten aus ihren Vorläuferzellen und somit enchondrale Ossifikation verursachen^{15,19}.

Knochenersatzmaterialien sollten resorbierbar sein, um durch neuen Knochen ersetzt zu werden^{3,13,15}, da nur der natürliche Knochen über die optimale biomechanische Stabilität und Biokompatibilität verfügt.

2.2.1 Charakterisierung der in der vorliegenden Studie verwendeten Knochenersatzmaterialien

In der vorliegenden Studie werden ausschließlich Substanzen beurteilt, die sich bereits in vorangegangenen Studien bewährt hatten und denen ein guter Knochenzuwachs bescheinigt wurde. In den Untersuchungen von Apelt, Apfel, von Doernberg, Kemper und Génot lag der

Schwerpunkt auf dem osteokonduktiven Potential der Materialien. Die im Bohrloch vorgefundenen Zelltypen wurden nicht näher untersucht. Die Defekte waren nach 8 (bzw. 6) Wochen in Abhängigkeit der Resorptionsgeschwindigkeit des Materials zu durchschnittlich ca. 32% mit neuer Knochensubstanz gefüllt^{20,21,22,23,24}.

In der vorliegenden Untersuchung kamen Knochenersatzmaterialien aus der Klasse der Hydrogele, der Kalziumphosphat-Verbindungen und Seiden zum Einsatz. Diese sollen im Folgenden kurz charakterisiert werden.

2.2.1.1 Hydrogele

Unter Hydrogelen versteht man polymere Netzstrukturen, sog. Matrices, die durch ihre chemische Struktur hydrophil sind und ein Vielfaches ihres Trockengewichtes an Wasser einlagern können²⁵. Man unterscheidet zwischen Hydrogelen natürlichen und synthetischen Ursprungs.

Zu den *natürlichen* Hydrogelen gehören unter anderem Kollagen, Fibrin und Gelatine²⁶. Als Basis für die in dieser Studie eingesetzten Hydrogele natürlichen Ursprungs diente Fibrin. **Fibrin** ist ein natürliches Produkt der Blutgerinnungskaskade und entsteht durch die Einwirkung von Thrombin aus Fibrinogen. Fibrin bildet eine netzartige Struktur, an die sich Thrombozyten und Erythrozyten anlagern und einen Thrombus bilden, der den Endotheldefekt im Gefäß verschließt. Durch die Einwirkung von Plasmin (aus Plasminogen) wird im Rahmen der Wundheilung das Fibrinnetz wieder aufgelöst (sog. Fibrinolyse)²⁷.

Fibrin wird schon länger bei verschiedenen chirurgischen Indikationen eingesetzt, beispielsweise in Form von Gewebeklebern²⁸.

Auch als Trägersubstanz für Wachstumsfaktoren oder Antibiotika wurde Fibrin mit Erfolg verwendet^{29,30}. Die Biokompatibilität ist sehr hoch, da es eine körpereigene Substanz ist, die aus allogenen Quellen gewonnen werden kann. Dabei besteht jedoch die Gefahr der Übertragung von Krankheitserregern³¹. Bei der Verwendung von allo- oder insbesondere xenogenem Fibrin ist aufgrund der Proteinstruktur eine Allergisierung möglich, was zu einer Abstoßungsreaktion führen kann.

Das in dieser Studie eingesetzte *synthetische* Hydrogel **Polyethylenglykol (PEG)** ist ein Polymer und besitzt eine gute Löslichkeit in Wasser. Seine guten pharmakokinetischen Eigenschaften machen es zu einem vielseitig eingesetzten Produkt, so wurden PEG-

Hydrogele als Trägersubstanz für osteokonduktive Proteine (u. a. Growth Hormone, GH, und Bone Morphogenic Protein, BMP) erfolgreich eingesetzt^{23,32,33}.

Die implantierte Matrix erfüllt die Funktionen der körpereigenen extrazellulären Matrix, die sich an einem Knochendefekt bildet. Unter anderem dient sie der Stabilität, sowie der gerichteten Zelleinsprossung und ermöglicht die Diffusion von Nährstoffen und Metaboliten zu und von den einwandernden Zellen³⁴. Hydrogele können als Trägersubstanz für Wachstumsfaktoren wie Bone Morphogenetic Protein (BMP) oder Insulin-like Growth Factor (IGF) dienen und konnten bei verschiedenen Indikationen erfolgreich eingesetzt werden^{32,33,35,36}. Selbst lebende Zellen können *in vitro* in die sog. Matrix eingeschlossen werden, so dass diese Stoffgruppe in zunehmendem Maße als Biomaterial im Zusammenhang mit Gewebeheilung eingesetzt wird^{33,34,36}.

Die Wirkstoffe werden freigesetzt (sog. Releasing), indem sich die Porengröße der polymeren Matrix bei Wasseraufnahme ändert. Es kommt zur Schwellung des Hydrogels, die Poren weiten sich und der in Makromolekülen gespeicherte Wirkstoff kann in die Umgebung diffundieren. Das Releasing ist somit abhängig von der Porengröße der Matrix. Eine japanische Studie konnte nachweisen, dass die Freisetzung von BMP-2 aus einem Hydrogel auf Gelatine-Basis in Abhängigkeit vom Abbau des Hydrogels erfolgt³⁶. Hydrogele werden in zunehmendem Umfang auch in der Kombination mit Kalziumphosphat-Verbindungen als sog. Composites eingesetzt^{34,37,38}.

Die meisten Hydrogele sind resorbierbar, extrazellulär durch Hydrolyse in wässriger Lösung und enzymatisch, sowie intrazellulär durch Makrophagen und Fremdkörperriesenzellen^{25,39}. Die intrazelluläre Spaltung erfolgt mithilfe freier Radikale, Hydrogenperoxid und Superoxiden³⁹. Hydrogele sind biokompatibel, da ihre hydrophile Oberfläche die Anlagerung von Proteinen und Zellen einschränkt²⁵, und sie besitzen osteogenetisches Potential⁴⁰.

2.2.1.2 Kalziumphosphat-Verbindungen

Mischt man Kalziumphosphat-Verbindungen mit einer wässrigen Lösung, so kommt es zur Ausfällung von Kalziumphosphat-Kristallen⁴¹, die sich untereinander vernetzen und so eine gewisse mechanische Stabilität aufweisen. Kalziumphosphat-Verbindungen, die bei der Herstellung von Medizinprodukten verwendet werden, lassen sich nach Bohner aufgrund ihres Herstellungsprozesses in Zemente und Keramiken unterteilen⁴¹.

Zemente entstehen durch eine Aushärtungsreaktion, die bei Raumtemperatur stattfindet, so dass sie zunächst eine flüssige bis pastöse Konsistenz aufweisen und injizierbar sind.

Keramiken härten dagegen bei hohen Temperaturen aus und werden vorgefertigt als sogenannte pre set- Materialien in Form von dichten oder porösen Blöcken oder Granula eingesetzt. Die mechanische Belastbarkeit der ausgehärteten Kalziumphosphat-Verbindungen reicht jedoch nicht zur Stabilisierung größerer Knochendefekte aus⁴². Häufig werden Kalziumphosphat-Zemente daher als Beschichtung von Metallimplantaten¹³ eingesetzt, um das Implantat besser im Knochen zu verankern, beispielsweise bei Zahnimplantaten⁴³ oder Totalendoprothesen⁴¹. Weitere Einsatzmöglichkeiten sind Knochenrekonstruktionen in der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und Wirbelfusionen⁴³. Kalziumphosphat-Zemente werden außerdem als Trägersubstanzen, z. B. für Antibiotika eingesetzt^{44,45}.

Der Vorteil der Knochenzemente liegt in der geringen Wärmeentwicklung während der Aushärtungsphase, sowie der initial guten Modellierbarkeit, die einen engen Kontakt zum Knochendefekt gewährleistet. Grundsätzlich lassen sich zwei Gruppen von Kalziumphosphat-Zementen unterscheiden⁴¹.

2.2.1.2.1 Mikrokristalline Hydroxyapatit Zemente ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, precipitated

Hydroxyapatite, PHA)

Die Zemente dieser Gruppe sind dem Apatit im Knochen sehr ähnlich, je nach eingesetzten Verbindungen entstehen in der Ausfällungsreaktion bei basischem pH-Wert dabei Kristalle mit einem Kalzium-Phosphat-Verhältnis von 1,5 bis 1,67. Die Löslichkeit und damit die Geschwindigkeit der Biodegradation ist von diesem Verhältnis abhängig, denn bei einem größeren Phosphat- Anteil kommt es zu einer höheren Löslichkeit. Die mechanischen Eigenschaften hängen auch von der Porengröße des Endproduktes ab, die durch das Verhältnis Zementpulver zu Flüssigkeit beeinflusst wird. Je größer die Poren, desto geringer ist die mechanische Stabilität⁴¹. Verwendung finden diese Zemente, von denen mittlerweile zahlreiche kommerziell erhältlich sind, in der Frakturversorgung, bei chirurgischen Eingriffen am Schädel und zum Fixieren von zementierten Gelenkprothesen^{4,13,46,47}.

Nachteilig ist die lange Resorptionsdauer, so dass die Knochenneubildung gehemmt wird. Auch dauert die Aushärtung relativ lange, was aber durch die Zugabe verschiedener Phosphatverbindungen auf 10-15 Minuten verkürzt werden kann⁴¹.

Der Abbau von Apatit erfolgt nach Böhner allein durch Osteoklasten⁴¹, nach Lu et al.⁴⁸ überwiegend zell-mediiert durch verschiedene Phagozyten (Osteoklasten, Makrophagen, mehrkernige Riesenzellen). Laut Gazdag et al. erfolgt der Abbau von Hydroxyapatit ausschließlich durch mehrkernige Riesenzellen¹⁰, die von anderen Autoren auch als

Osteoklasten-ähnliche Riesenzellen bezeichnet werden^{2,20,49}. Diese von Brown und Chow⁵⁰ in den achtziger Jahren in die Dentalchirurgie eingeführten Zemente aus der Gruppe der Hydroxyapatite weisen eine sehr gute Bioverträglichkeit auf⁴¹.

2.2.1.2.2 Dikalziumphosphat-dihydrat Zemente (DCPD, Brushite)

Zemente dieser Gruppe weisen eine höhere Löslichkeit als die Apatite auf, so dass sie auch als „brushite hydraulic cements“ bezeichnet werden⁴¹. Hier findet die Abbindungs- und Aushärtungsreaktion in Form einer Säure-Base-Reaktion bei einem pH-Wert von ≤ 6 statt, wobei das Endprodukt einen annähernd neutralen pH-Wert aufweist⁵¹. Diese Zemente weisen eine flüssigere Konsistenz als die Apatite auf und härten schneller aus. Die resultierende mechanische Stabilität ist etwas geringer als die der Apatite, jedoch führen die ausgesprochen biokompatiblen und osteokonduktiven Eigenschaften dieser Zementgruppe zu einer raschen Ablagerung von neu gebildetem Knochengewebe^{20,52,53}. Hierbei ist jedoch von Nachteil, dass die Resorptionsgeschwindigkeit aufgrund der hohen Löslichkeit so hoch sein kann, dass zeitgleich nicht genügend Knochensubstanz nachgebildet werden kann. Dabei kann es zur Bildung von unreifem Faserknochen kommen, der nur über eine geringe mechanische Stabilität verfügt⁴¹. Hier hat sich der Zusatz von β -Tricalciumphosphat (β -Ca₃(PO₄)₂, β -TCP)-Granula zur Zementpaste bewährt^{21,54}. An diesen Granula kann neues Knochengewebe „ankern“.

Da Brushite-Zemente metastabil sind, kann es *in vivo* zu PHA umgebaut werden, wobei es zur Absenkung des lokalen pH-Wertes kommt, was zu einer Entzündungsreaktion führen kann⁴¹. Oberle et al. beobachteten das vermehrte Auftreten mehrkerniger Riesenzellen zu Beginn ihrer Studie (nach 2 und 4 Wochen) und werteten dies als entzündliche Reaktion auf den Aushärtungsvorgang, da die Zellzahlen im weiteren Verlauf der Studie rückläufig waren⁴⁷.

Die Biodegradation von Brushite-Zementen erfolgt überwiegend durch Dissolution⁴⁸ und auch durch phagozytierende Zellen, überwiegend Makrophagen^{47,55}.

Brushite-Zemente weisen eine sehr gute Biokompatibilität auf^{52,53}.

2.2.1.2.3 Kalziumphosphat-Keramiken: Hydroxyapatit und β -Tricalciumphosphat (β -TCP)

Keramiken entstehen durch Kalziumphosphat Verbindungen, die im Herstellungsprozess auf mehr als 800 °C erhitzt werden. Als feste Materie liegen sie in Form von Granula oder Blöcken vor. Weil Hydroxyapatit-Keramiken zwar der natürlichen Knochenzusammensetzung am ehesten entsprechen, jedoch nach dem Erhitzungsprozess zum Teil während Jahrzehnten nicht mehr resorbierbar sind⁴¹, kommen vor allem die langsam resorbierbaren β -TCP-Keramiken als Knochenersatzmaterial zum Einsatz. β -TCP wird innerhalb von 6 Monaten zu 85 % resorbiert². Obwohl β -TCP als Gerüst für den neuen Knochen dient, scheint es keine osteoinduktiven Fähigkeiten zu besitzen⁴². Da β -TCP-Keramiken nur über geringe mechanische Stabilität verfügen, sind sie gut geeignet zur Füllung von Hohlräumen in wenig belasteten Gebieten. Die Biodegradation des β -TCP erfolgt durch Osteoklasten² und Dissolution⁴².

2.2.1.3 Kalziumsulfat-hemihydrat (CSH, $(\text{CaSO}_4) \cdot \text{H}_2\text{O}$, „Plaster of Paris“)

Bereits im 19. Jahrhundert wurde von Dreesman ein neuartiges Knochenersatzmaterial (Gips) eingesetzt⁵⁶. Vorteilhaft ist die Kitt-ähnliche Konsistenz, die eine Modellierung an unregelmäßig geformten Knochenkanten und damit ein einfaches Handling erlaubt^{24,42}. Dieses synthetisch hergestellte, resorbierbare und biokompatible Material zeigt nur eine geringe mechanische Stabilität und ist daher bei größeren Defekten nicht, bzw. nur in Kombination mit anderen Materialien geeignet, bzw. wird als Trägersubstanz u. a. für Antibiotika verwendet¹³.

Kalziumsulfat wird innerhalb weniger Wochen resorbiert und stimuliert dabei die Osteoblasten-Aktivität: das Material löst sich im Gewebe und die Kalziumionen bilden Kalziumphosphat, welches auf der Oberfläche des Materials präzipitiert und so ein für Osteoblasten attraktives Milieu erzeugt⁵⁷. Hadjipavlou et al. stellten eine dem autologen Knochenersatz entsprechende Osteokonduktion des „Plaster of Paris“ fest⁵⁸. Génot bestätigt eine gute Knochenneubildungsrate und Biokompatibilität²⁴. Aufgrund der hohen Löslichkeit wird Kalziumsulfat rasch resorbiert, es war im Bohrloch-Modell bereits nach zwei Monaten nicht mehr nachweisbar²⁴.

2.2.1.4 Seide

Seide ist ein natürliches Polymer auf Proteinbasis und wird unter anderem durch die Seidenraupe *Bombyx mori* und die Seidenspinne *Nephila claviceps* produziert. In der Medizin kommen überwiegend die Fasern der Seidenraupe zum Einsatz⁵⁹. Die Polymere bestehen aus zwei langkettigen Proteinen, die in ihrer Primärstruktur eine hohe Repetitionsquote besitzen, so dass die Sekundärstruktur eine hohe Homogenität aufweist. Bei natürlichen Seidenfasern werden die einzelnen Faseranteile durch das Protein Sericin miteinander verbunden⁶⁰.

Die von Seidenfasern natürlichen Ursprungs provozierte Immunreaktion (Granulombildung, Allergisierung^{61,62,63}) lässt sich vor allem auf das Sericin zurückführen, welches jedoch im Verarbeitungsprozess entfernt werden kann. Als Implantate gelangen vorgefertigte dreidimensionale Matrices zum Einsatz, die je nach Herstellungsverfahren über Poren unterschiedlicher Durchmesser verfügen, um durch die größere Oberfläche des Implantates den Resorptions- und Durchbauprozess zu beschleunigen. Die Poren entstehen dabei entweder durch die Einlagerung von Paraffin oder Salz (Natriumchlorid), wobei das Paraffin wegen seines möglichen proinflammatorischen Potentials im Rahmen des Herstellungsverfahrens chemisch extrahiert und das Salz durch Wasserbäder ausgewaschen wird^{60,64}.

Da Seidenfasern zu den stärksten natürlichen Fasern zählen⁶⁵, werden sie schon seit Jahrhunderten als chirurgisches Nahtmaterial verwendet⁶⁶. Da es heute eine Vielzahl neuer Nahtmaterialien gibt, ist Seide als Fadengrundlage in den Hintergrund gerückt⁶⁶, aber seit einigen Jahren erleben Seidenproteine eine Renaissance in der Biotechnologie. Seidenmatrices wurden unter anderem als Knochenersatzmaterial^{67,68} und als Beschichtung für Biomembranen⁶⁹ erfolgreich getestet.

Seidenfasern sind sehr stabil gegenüber Kompressions- und Torsionskräften⁶⁰. Bei Verwendung als Knochenersatzmaterial hat sich die Verwendung von Seidengerüsten als dreidimensionale Matrix (sog. scaffold) bewährt, die durch ein spezielles Porensystem eine gleichmäßige Durchbauung der Matrix mit Bindegewebe gestattet und so ein gerichtetes Knochenwachstum ermöglicht^{64,70}. Die langsame Resorption ist ein großer Vorteil der Seidenfasern beim Einsatz als Gerüstsubstanz für Knochenersatzmaterialien: der Körper kann den Defekt mit stabilem Knochengerst überbrücken, während die mechanische Stabilität der Seidenfasern nachlässt^{64,70}. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass diese Matrices osteogenetisches Potential bei humanen Mesenchymalen Stammzellen (hMS) besitzen und so *in vivo* die Knochenheilung beschleunigen^{60,67,69,70}.

Für die Resorbierbarkeit von Seide liegen unterschiedliche Ergebnisse vor, die von dem Verlust der Reißfestigkeit um 55 % nach 42 Tagen⁷¹ bis zu 83 % nach 70 Tagen (nach subkutaner Implantation bei Ratten⁷² reichen. *In vivo* wird Seide langsam resorbiert, je nach Lokalisation, umliegendem Gewebe, mechanischer Belastung, Durchmesser des verwendeten Materials und Immunstatus des Patienten⁷³.

Die Biodegradation der Seiden erfolgt durch proteolytische Enzyme (u. a. durch Proteasen wie Chymotrypsin⁶⁰) und Phagozytose: da die Fasern für eine primäre Resorption durch Makrophagen zu groß sind⁷⁴, kommt es zur Bildung mehrkerniger Riesenzellen⁷⁵.

Seide besitzt eine hohe Biokompatibilität^{67,70,74}.

2.3 Tiermodelle zur Erprobung von Knochenersatzmaterialien

Bei der Auswahl des geeigneten Versuchsmodells zur Erprobung eines Knochenersatzmaterials sind je nach Fragestellung verschiedene Faktoren zu berücksichtigen.

2.3.1 Auswahl der Versuchstiere

Das Tiermodell muss so gewählt werden, dass die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind⁷⁶.

Als Versuchstiere stehen vor allem Mäuse, Ratten, Kaninchen, Katzen, Hunde, Schafe, Ziegen und Pferde zur Verfügung, in Einzelfällen finden auch Untersuchungen an Geflügel oder Primaten statt⁷⁶. Zu beachten sind anatomische und biologische Unterschiede zwischen den einzelnen Tierarten, die die Frakturheilung beeinflussen, so verfügen beispielsweise kleine Nagetiere wie Mäuse und Ratten über eine primitivere Knochenstruktur⁷⁶. Auch unterschiedliche Reaktionen auf bestimmte Medikamente, beziehungsweise das Fehlen spezifischer Stoffwechselwege führt zu divergierenden Effekten je nach Spezies und Dosis. Ein Beispiel ist der Einfluss nicht-steroidaler Entzündungshemmer oder Antibiotika auf die Frakturheilung⁷⁶.

Je nach Projekt und Fragestellung muss die am besten geeignete Tierart gewählt werden, wobei aus Tierschutzgründen das phylogenetisch am tiefsten stehende, zur Fragestellung passende Tier zu bevorzugen ist. So bieten sich kleine Nagetiere beispielsweise für die subkutane Implantation von Biomaterialien, nur bedingt aber für Osteosynthesen an⁷⁶.

Im Rahmen von Fraktur- und v. a. Osteosynthesestudien haben sich Schafe seit Jahren bewährt. Sie werden von der „Association for the Study of Internal Fixation“ als Versuchstiere empfohlen⁷⁶ und in zunehmendem Maße in der orthopädischen Forschung eingesetzt⁷⁷. Schafe besitzen eine dem Menschen ähnliche Knochenstruktur und –heilung^{76,78}, so dass für den Menschen konstruierte Implantate vergleichbaren Belastungen in Bezug auf Größe und Gewicht ausgesetzt sind⁷⁸. Da Schafe ihre Gliedmaßen postoperativ frühzeitig belasten, können sie gut in Studien eingesetzt werden, bei der es auf eine rasche Belastung des Knochens ankommt⁷⁶.

Um eine einheitliche Population zu gewährleisten, werden gleichgeschlechtliche Tiere derselben Altersgruppe bevorzugt.

Einzubeziehen sind in die Entscheidung auch Kosten für Anschaffung und Unterhalt, Verfügbarkeit und Haltungsbestimmungen, sowie die Akzeptanz der Bevölkerung⁷⁸. Um statistisch verwertbare Ergebnisse zu erzielen, werden nach internationalem Standard mindestens vier Kaninchen bzw. zwei Hunde, Schafe, Ziegen oder Schweine pro Versuchsgruppe empfohlen⁷⁸.

2.3.2 Auswahl des Versuchsmodells

Bei der Erprobung von Knochenersatzmaterialien werden zunächst *in vitro*-Studien durchgeführt, bei denen in Zellkulturen akute Zytotoxizität und Biokompatibilität der Testsubstanz ermittelt werden⁷⁸. So werden unterschiedliche Zelltypen in Gegenwart der Biomaterialien kultiviert und verschiedene Parameter wie die Aktivierung von Makrophagen, Lymphozyten und Osteoklasten, sowie die Bildung und das Zusammenspiel von mehrkernigen Riesenzellen und Zytokinen beurteilt^{74,79,80,81,82,83,84}. Ebenso können der Einfluss der Biomaterialien auf die Adhäsion von Bakterien⁸⁵ und die Induktion der Apoptose von Makrophagen⁸⁴ untersucht werden.

Im Anschluss daran finden Biokompatibilitätsstudien *in vivo* statt, bei denen das zu testende Material subkutan oder intramuskulär eingebracht wird^{25,32,86,87,88,89}. Da diese Ergebnisse zwar hinsichtlich der humoralen und zellulären Immunität wertvoll sind, jedoch keinen direkten Rückschluss auf die Biokompatibilität im Knochen sowie osteoinduktive und –konduktive Eigenschaften ermöglichen⁷⁷, sind danach Studien am Knochen nötig.

Beim **Bohrloch-Modell** werden die zu testenden Substanzen in Bohrlöcher (sog. drill holes) eingefüllt, die an den langen Röhrenknochen^{2,20,21,48,49,54,55,90,91,92} am Schädel⁴⁷ bei großen Versuchstieren wie Kaninchen, Hunden oder Schafen unter standardisierten Bedingungen⁷⁷

angebracht werden. Vorteile des Bohrloch-Modells sind das geringe Weichteiltrauma, die fehlende mechanische Belastung der Implantate und die geringe Belastung für die Versuchstiere⁷⁷. Da bis zu acht Substanzen an vergleichbaren Lokalisationen in einem Tier getestet werden können⁷⁷, lässt sich die Anzahl der Versuchstiere reduzieren. Die Knochen mit den implantierten Biomaterialien können makroskopisch, radiologisch, histomorphometrisch und histomorphologisch ausgewertet werden.

Bei **Defekt-Osteotomie-Modellen** wird ein Teil des Knochens entfernt und der Spalt dann teilweise mittels Osteosynthese wieder stabilisiert und / oder mit dem zu testenden Knochenersatzmaterial aufgefüllt^{33,53,93}. Hierbei lässt sich auch die mechanische Stabilität eines Biomaterials untersuchen.

Sog. **Critical Size-Defekte** ermöglichen Aussagen über die Osteoinduktivität eines Biomaterials. Die Defekte werden dabei entweder an Röhrenknochen^{36,40,68,75} oder an Schädelknochen⁶⁷ gesetzt. Critical size heißt, dass ein Frakturspalt dieser Größe durch natürliche Knochenheilung nicht überbrückt werden kann und es ohne weitere Therapie zur Bildung eines bindegewebigen Ersatzgewebes käme.

Für Fragestellungen der Frakturheilung bieten sich das **Fraktur-Modell** an. Dabei wird durch mechanische Einwirkung eine Fraktur produziert. Es entsteht eine größere Oberfläche der Frakturenenden als beim Osteotomiemodell und die Frakturenenden können sich mitunter berühren und dadurch gegenseitig stabilisieren⁷⁶. Bei geschlossenen Frakturen, die bei kleinen Nagern leicht reproduzierbar sind, bleibt das Hämatom im Frakturspalt erhalten⁷⁶ und das Infektionsrisiko wird minimiert. Dieses Modell ermöglicht zwar eine Beurteilung der Knochenheilung, nicht jedoch das Einbringen eines Knochenersatzmaterials.

2.4 Biodegradation und Resorption von Implantaten

2.4.1 Vor- und Nachteile biodegradierbarer Implantate

Abbaubare Platten, Pins und Schrauben haben den *Vorteil*, dass kein zweiter chirurgischer Eingriff erforderlich ist⁹⁴. Zudem erlauben resorbierbare Knochenersatzmaterialien eine stetig zunehmende Gewichtsaufnahme im neu durchbauten Knochen³ und führen so zu einer erhöhten Stabilität im Knochengewebe, wobei im Idealfall die Resorptionsgeschwindigkeit mit der Bildungsrate des neuen Knochens übereinstimmt^{53,58,91}. Es wurde bewiesen, dass die

Irritation, die durch eine minimale Bewegung im Frakturspalt hervorgerufen wird, zu einer Intensivierung der Entzündungsreaktion und als deren Folge zu einer verbesserten Durchblutung führt und somit die Heilung beschleunigt werden kann⁹⁵.

In zunehmendem Maße werden abbaubare Implantate mit Mediatoren oder Medikamenten kombiniert, wobei der Wirkstoff während des Abbaus freigesetzt wird und so über einen längeren Zeitraum wirken kann. Dies kommt unter anderem bei Zementen mit antibiotischen Zusätzen^{44,45} sowie Hydrogelen und Seidengerüsten mit Zusatz von Bone Morphogenetic Protein^{33,35,36,67} oder Growth Factor³² zum Einsatz. Die Resorptionsgeschwindigkeit wird durch die Zusammensetzung und Struktur des Implantates bestimmt, etwa durch Oberflächenbeschaffenheit (physikalische und chemische Einflüsse) und Porengröße^{52,96}.

Resorbierbare Implantate können jedoch auch *Nachteile* haben, da die Biodegradation ein individueller Prozess ist, der von einer Vielzahl von Faktoren (Alter, Immunstatus, Gewebetyp) abhängt. Die Dauer des Resorptionsvorganges lässt sich daher nicht genau vorhersagen³⁹. Da es sich bei Biodegradation und Resorption um Entzündungsreaktionen zur Beseitigung von Fremdmaterial handelt, besteht die Möglichkeit einer chronischen Entzündung, die zur Bildung einer bindegewebigen Kapsel im Sinne eines Fremdkörpergranuloms führt, so dass gegebenenfalls doch eine zweite Operation erforderlich wird^{63,97}.

Es gibt Implantate, bei denen Biodegradation und Resorption nicht erwünscht sind, beispielsweise bei der Verwendung künstlicher Herzklappen, Stents, Herzschrittmachern, Linsen, Zahnprothesen, Menisken oder Totalendoprothesen als Gelenkersatz. In diesem Fall ist die Materialzusammensetzung und -beschaffenheit so zu wählen, dass Körpermilieu und Immunantwort das Material nicht schädigen können und die Funktion des Implantats nicht – zum Beispiel durch die Bildung einer Bindegewebskapsel – eingeschränkt wird. Für die Mund-, Kiefer-, Gesichts- und orthopädische Chirurgie stehen seit vielen Jahren sowohl resorbierbare als auch nicht resorbierbare Implantate zur Verfügung. Die Entscheidung für das jeweils optimale Implantat muss individuell gefällt werden.

Der *Nachteil* von nicht-resorbierbaren Implantaten besteht darin, dass eine zweite Operation zur Implantatentfernung mit den damit verbundenen Risiken und Schmerzen notwendig ist³ und der Knochen durch die Implantatentfernung wieder geschwächt wird. Dabei müssen die durch die Entfernung nicht resorbierbarer Schrauben entstandenen Hohlräume im Knochen erst durchbaut werden und es besteht die Gefahr von Refrakturen³. Zusätzlich stellt das

persistierende nicht-resorbierbare Implantat einen Reiz dar, der mit der Gefahr einer Abstoßungsreaktion und möglicher Infektion einhergeht. Implantatlockerung und verzögerte Abstoßungsreaktion durch Freiwerden von Implantatdetritus bzw. Korrosionspartikeln spielen bei metallischen Implantaten eine größere Rolle als bei der Verwendung resorbierbarer Implantate⁹⁸. Ein weiterer Nachteil besteht in der möglicherweise kanzerogenen Wirkung durch den Dauerreiz rigider Implantate bzw. durch die bei Korrosion frei werdenden Metallionen^{86,99}.

2.4.2 Wege der Biodegradation von Knochenersatzmaterialien

Nach der Implantation ist ein Biomaterial physikalischen, chemischen und biologischen Angriffen ausgesetzt. Die Biodegradation erfolgt in einem Zusammenspiel dieser Faktoren, je nach Materialbeschaffenheit in unterschiedlichem Ausmaß.

Physikalische Einflüsse sind dabei mechanische Belastung und Reibung, die zum Verlust der Stabilität führen können^{3,39}. Abschilferungen der Implantatoberfläche führen dazu, dass Partikel in das umliegende Gewebe gelangen und ihrerseits die zelluläre Immunantwort stimulieren^{4,48}. Dies wird durch Form und Struktur der Oberfläche, sowie die Größe und Architektur von Poren und Kristallen beeinflusst^{10,48}.

Chemische Vorgänge beinhalten die Lösung von Ionen (u. a. Ca, P) aus dem eingebrachten Material und die Anlagerung von Ionen an die Implantatoberfläche, deren Intensität von der chemischen Zusammensetzung des Implantates abhängt. Dabei lösen sich Ionen je nach pH-Wert des umliegenden Gewebes, Hydrophilie und elektrischer Ladungsverteilung im Material^{49,51,55,57}.

Die zelluläre Degradation erfolgt extra- und intrazellulär durch lytische Enzyme (Proteasen, Lipasen, Peptidasen, saure Hydrolase) und freie Sauerstoffradikale aus den Phagozyten. Zu diesen zählen Makrophagen, Osteoklasten und mehrkernige Riesenzellen, die auch als Fremdkörperriesenzellen bezeichnet werden. Die Abbaurate wird durch individuelle Faktoren wie Grad des Knochenkontaktes, Art des Knochens, Tierart, Alter, Geschlecht, Hormonstatus, genetische Prädisposition und Infektionen beeinflusst⁴⁸.

Der lokale pH-Wert wird dabei unter anderem durch Osteoklasten moduliert, die unter der Einwirkung von Parathormon vermehrt Milchsäure bilden und den pH-Wert auf unter 6 senken können. Hierdurch lösen sich Mineralstoffe wie Kalziumphosphate und Kalziumsulfat und zudem werden lysierende Enzyme aktiviert⁵¹. Für die zelluläre Resorption ist neben der Materialzusammensetzung die Oberflächengestaltung des Implantates von entscheidender

Bedeutung. So bieten Poren eine größere Oberfläche und somit mehr Angriffsmöglichkeit für die Phagozyten und das Einwachsen von Gefäßen^{2,100}, wobei die Porengröße den Grad der Biodegradation mit beeinflusst^{2,52,22}. Fehlen Makroporen (Durchmesser $\geq 100\text{ }\mu\text{m}$), so kann die Biodegradation nur schichtweise von außen nach innen erfolgen^{41,95}, was die Resorptionsgeschwindigkeit stark herabsetzt. Partikel mit einer Größe von 10-20 μm können dagegen von Makrophagen direkt phagozytiert werden⁸⁸.

2.4.2.1 Herkunft der Phagozyten

Die Phagozyten entstammen dem Monozytären Phagozytose-System (MPS) und haben ihre Vorläuferzellen in Monoblasten des hämatopoietischen Gewebes, welche zunächst im Knochenmark reifen, anschließend für 2-3 Tage im Blut als Monozyten zirkulieren und dann im Gewebe zu spezialisierten Phagozyten heranreifen¹⁰¹. Zu diesen zählen unter anderem die Kupfferschen Sternzellen der Leber, die Mikroglia im Hirngewebe, die Alveolarmakrophagen, die Histiozyten (Gewebsmakrophagen) und Osteoklasten¹⁰¹.

2.4.2.2 Bedeutung der Makrophagen, mehrkernigen Riesenzellen und Osteoklasten bei der Resorption von Knochenersatzmaterialien

Die zell-medierte Biodegradation erfolgt überwiegend durch Makrophagen^{21,47,55,81,82}, bei Kalziumphosphat- Verbindungen auch durch Osteoklasten^{41,53} bzw. „Osteoklasten-ähnliche“ Zellen^{2,51,82,91,102,103,104,105,106} und je nach Material werden auch mehrkernige Riesenzellen angetroffen^{42,105,107,108,109}.

Die zur Phagozytose und Pinozytose befähigten **Makrophagen** sind an allen unspezifischen Entzündungsreaktionen wesentlich beteiligt und modulieren ihrerseits über Cytokine und Membranrezeptoren die Funktion der Lymphozyten. Durch Chemotaxis gelangen Monozyten an die Implantatoberfläche, an die Proteine angelagert sind. Eine besondere Rolle spielen hierbei die Proteine Fibrinogen und Fibronectin⁸⁰, an die Monozyten über Integrin-Rezeptoren binden. Es kommt zur phänotypischen Transformation der Monozyten zu Makrophagen, was mit einer Zunahme der Zellgröße und einem starken Anstieg der Produktion und Freisetzung von Mediatoren wie Cytokinen und Chemokinen, u. a. Interleukin (IL) -2 und -6 einhergeht^{79,80}. Makrophagen können neben neutrophilen Granulozyten bereits in der frühen Entzündungsphase (Stunden bis Tage nach einer Gewebsverletzung) nachgewiesen werden, haben jedoch eine längere Lebensdauer von Tagen bis Wochen¹¹⁰,

weshalb sie das Zellbild zunehmend dominieren. Gelingt es den Makrophagen nicht, den Fremdkörper zu beseitigen, so können sie zu mehrkernigen Riesenzellen verschmelzen. Diese weisen eine Größe von 40-100µm auf und enthalten, je nach Anzahl der fusionierten Makrophagen, zwischen 10 und 200 Nuclei⁴².

Die Bildung von **mehrkernigen Riesenzellen** ist von einer Vielzahl von Faktoren und Mediatoren abhängig^{111,112}. Es kommt zu einer Aktivierung von T-Lymphozyten durch einerseits IL-2 und IL-6 aus den aktivierten Makrophagen, andererseits über Antigenpräsentation der Makrophagen durch Major Histokompatibilitätsmoleküle (MHC II)⁷⁹. Die Freisetzung von IL-4 und IL-13 aus den T-Lymphozyten führt zu einer durch Mannose-Rezeptoren vermittelten Fusion zu Riesenzellen^{13,80,111}. Durch die Fusion sind Riesenzellen in der Lage, die 20- bis 30-fache Menge an Sauerstoffradikalen im Vergleich zu Makrophagen zu produzieren¹⁰⁷. Ihre Aufgabe ist es, mit Hilfe von lytischen Enzymen wie der sauren Phosphatase und freien Sauerstoffradikalen das Fremdmaterial zu zerstören oder den Fremdkörper durch wallartige Begrenzung zumindest zu isolieren^{101,113}. Es konnten mehrkernige Riesenzellen während der gesamten Implantationsdauer von nicht resorbierbaren Materialien nachgewiesen werden, wobei unklar ist, ob diese ruhen oder aktiviert bleiben¹¹⁴. Mehrkernige Riesenzellen können sich weder mitotisch noch amitotisch teilen und unterliegen der Apoptose¹⁰³.

Durch einen vergleichbaren Fusionsvorgang entstehen **Osteoklasten** aus mononukleären Zellen, die ebenfalls von den hämatopoietischen Stammzellen abstammen¹¹⁵. Die Vorläuferzellen besitzen zum einen Eigenschaften der Makrophagen wie die unspezifische Esterase und zum anderen die Osteoklasten-typischen Eigenschaften wie die Tartrat-resistent-Acid-Phosphatase (TRAP) und Calcitonin-Rezeptoren^{105,106}. Preosteoklasten verschmelzen durch den Einfluss vieler Faktoren, unter anderem dem Macrophage Colony Stimulating-Factor (MCSF) und IL-3, zu Osteoklasten. Die Anwesenheit von 1,25-Dihydroxy Vitamin D3 scheint dabei für die Fusion obligatorisch zu sein^{103,106}.

Osteoklasten sind als einzige Zellen auf die Resorption von Knochen spezialisiert¹⁰³. Ihre Aufgabe ist es, nach einer Integrin-Rezeptor-vermittelten Anlagerung an die Knochensubstanz, diese durch Säuresekretion und Freisetzung proteolytischer Enzyme lakunenartig aufzulösen und anschließend die organischen und anorganischen Matrixkomponenten mittels Endocytose aufzunehmen¹⁰⁶. Sie besitzen dazu eine lokal begrenzte Bürstensaummembran oder „ruffled boarder“, woran Osteoklasten phänotypisch zu

identifizieren sind¹¹⁵. Diese villi-artigen Fortsätze der Plasmamembran umschließen die resorbierte Zone, die sog. Howshipsche Lakune. Obwohl es sich bei den Osteoklasten um hoch spezialisierte Zellen handelt, konnte in Zellkulturen bestätigt werden, dass sie auch in der Lage sind, Biomaterialpartikel wie Latex, Titan und Polymethylmetacrylat- (PMMA) Partikel aufzunehmen¹⁰². Dabei behalten sie ihre phänotypischen Eigenschaften bei¹⁰². Wie Riesenzellen können sich auch Osteoklasten nicht mehr teilen¹⁰³.

Die Fusion von Osteoklasten und mehrkernigen Riesenzellen wurde in zahlreichen *in vitro*-Studien untersucht^{79,80,107,111,112,116}.

2.5 Immunantwort auf Implantate und deren Biokompatibilität

2.5.1 Immunantwort auf Implantate

Der lebende Organismus reagiert auf jegliche Gewebsverletzung mit einer Entzündungsreaktion, um das betroffene Gewebe zu reparieren oder zu ersetzen^{113,114}. Dabei wird die Noxe vernichtet oder neutralisiert und der Weg für den Reparatursprozess mit dem Einwandern neuer Zellen bereitet¹¹³.

Es lassen sich humorale und zelluläre Immunität unterscheiden, wobei beide Systeme über Mediatoren eng miteinander verzahnt sind.

Die **humorale** Immunität wird unterteilt in unspezifische und spezifische Abwehr, wobei erstere durch Faktoren des Komplementsystems und andere Plasmaproteine vermittelt wird, so dass körperfremde Zellen abgetötet und körpereigene Zellen aktiviert werden. Lymphozyten als Vertreter der spezifischen, d.h. erworbenen Immunität, entwickeln sich aus lymphatischen Stammzellen, die ihrerseits von pluripotenten hämatopoietischen Stammzellen abstammen und in den primären lymphatischen Organen, im Knochenmark (bone marrow, B-Lymphozyten) oder im Thymus (T-Lymphozyten) heranreifen¹¹⁷. Gespeichert werden die ausgereiften Zellen in den sekundären lymphatischen Organen, Lymphknoten und Milz, ein Teil der Zellen zirkuliert im Blut. Die spezifische humorale Immunität erfolgt durch B-Lymphozyten, welche nach Antigenkontakt zu Plasmazellen für die Produktion spezifischer Antikörper, Immunglobuline der Klassen IgM, IgG, IgA und IgD und zu Gedächtniszellen differenzieren¹¹⁷.

Die **zelluläre** Immunität wird durch zytotoxische T-Lymphozyten vermittelt, die ebenfalls Gedächtniszellen bilden können. Zwischen humoraler und zellulärer Abwehr vermitteln T-Helfer-Zellen, die durch Antigen-präsentierende Makrophagen über MHC-II-Moleküle aktiviert werden und verschiedene Cytokine freisetzen, um ihrerseits B-Lymphozyten, zytotoxische T-Lymphozyten und Gedächtniszellen zu aktivieren¹¹⁸. Lymphozyten sezernieren Lymphokine wie Interferon- γ und Interleukin-1, 2 und 6, wodurch Monozyten angelockt und die Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen bewirkt werden^{98,119}. Aktivierte Makrophagen beeinflussen ihrerseits die Proliferation von B- und T-Lymphozyten und produzieren eine Vielzahl weiterer Faktoren wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Chemokine, Proteasen, Arachnidonsäuremetabolite, freie Sauerstoffradikale, Komplementfaktoren und Substanzen der Gerinnungskaskade¹¹⁹.

Die akute Entzündung dauert je nach Schwere der Verletzung Minuten bis Tage und geht mit lokaler Ödembildung und Ansammlung von neutrophilen Granulozyten einher¹¹⁴. Hyperämie und Ödembildung sind dabei das Zeichen einer lokalen Histaminfreisetzung¹⁰⁸.

Das Einbringen eines Implantates führt zu Schäden an Zellen und Gefäßen, so dass Thrombozyten mit Kollagen und der Basalmembran in Kontakt kommen. Durch die Thrombozytenakkumulation wird der intrinsische Weg der Blutgerinnung aktiviert, während das freigesetzte Thromboplastin den extrinsischen Weg initiiert¹¹⁹. Es kommt zur Freisetzung von weiteren Mediatoren wie Wachstumsfaktoren, chemotaktischen Substanzen und proteolytischen Enzymen und dadurch zur Anlockung von Leukozyten, vor allem neutrophilen Granulozyten. Diese vermitteln die akute Entzündungsreaktion, die in folgende Schritte unterteilt ist: (i) Adhäsion der Neutrophilen über Integrin-Membranrezeptoren an das Endothel, (ii) Diapedese und Emigration durch Chemotaxis an den Ort der Verletzung, (iii) Phagozytose und Freisetzung leukozytärer Produkte^{114,119}. Die primäre Aktivierung der Leukozyten erfolgt bei jeglichem eingebrachten Fremdmaterial und ist materialunabhängig¹¹⁹, da sie schon allein durch das Trauma des chirurgischen Eingriffs erfolgt⁵.

Kann der Fremdkörper durch neutrophile Granulozyten nicht beseitigt werden, so wird er durch die Anlagerung von Opsoninen markiert. Einfluss auf die Stärke der primären Immunreaktion hat die Anlagerung von Proteinen wie Albumin und Fibrinogen an die Oberfläche des Implantates unmittelbar nach dessen Kontakt mit Blut und Gewebe¹⁰⁸.

Kann die Noxe nicht oder nicht ausreichend durch die primäre Entzündungsreaktion beseitigt werden, so geht die akute in eine chronische Immunantwort über. Diese ist histologisch durch die Infiltration mit Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen gekennzeichnet, es kommt zur Vermehrung von Fibroblasten und kollagenem Bindegewebe und zum Einsprießen neuer

Gefäße¹¹⁹. Lymphozyten modulieren die Fremdkörperreaktion⁹⁸ und können zusammen mit Plasmazellen eine verzögerte Hypersensitivitätsreaktion auslösen¹¹⁰. Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen sind als Zeichen eines persistierenden Entzündungsreizes zu sehen¹¹⁴.

Sind auch die Makrophagen nicht in der Lage, den Fremdkörper zu beseitigen, so versucht der Körper, den Fremdkörper durch Bildung eines Granuloms zu isolieren^{98,113}. Dieses besteht in konzentrisch um das Fremdmaterial angelagerten Zellschichten aus aktivierten Makrophagen, die aufgrund ihres histologischen Erscheinungsbildes auch als Epitheloidzellen bezeichnet werden, Lymphozyten und ggf. Fremdkörperriesenzellen aus fusionierten Makrophagen (siehe 1.4.2.2) und ist durch einen Bindegewebsaum vom umliegenden Gewebe getrennt¹¹⁴. Die Fremdkörperreaktion ist nach Tang und Eaton „die natürliche Antwort auf unnatürliche Materialien“¹⁰⁸, allerdings kann es durch eine Granulationsgewebeschicht zwischen Knochen und Implantat zur Implantatlockerung und somit zum Funktionsverlust des Implantates kommen, was eine Entfernung desselben notwendig machen kann⁵.

2.5.2 Biokompatibilität von Implantaten

Biokompatibilität wird von Anderson als das morphologische Erscheinungsbild der Entzündungsreaktion um das Implantat definiert¹¹⁴. Middleton und Tipton definieren Biomaterialien als biokompatibel, wenn sie keine Entzündung hervorrufen, nicht toxisch und ihre Abbauprodukte metabolisierbar sind³. Galante et al. bewerten die Biokompatibilität im Hinblick auf Toxizität, Hypersensitivität und Kanzerogenität, wobei hier auch die frei werdenden Partikel und Zersetzungsprodukte zu berücksichtigen sind⁹⁹.

Je nach Wirkung des Materials auf das umliegende Gewebe wird es als bioinert, biotolerant oder bioaktiv bezeichnet⁵, wobei Shankar und Greisler die Bezeichnung „bioinert“ ablehnen und ein Material allenfalls als biotolerant bezeichnen, wenn die Gewebsreaktion weder die Funktion des Implantates noch die des Organs beeinträchtigt¹¹⁹. Bioaktive Materialien sind dazu gedacht, Gene zu aktivieren, die die Regeneration von lebenden Geweben stimulieren, indem sie beispielsweise die Freisetzung von Wachstumsfaktoren oder Bone Morphogenetic Protein fördern¹²⁰, wenn sie als Knochenersatzmaterial eingesetzt werden.

Die Biokompatibilität wird von der Art des Implantates und dem umliegenden Gewebe beeinflusst: Hydrophile und anionische Verbindungen auf der Implantatoberfläche können die Apoptose von Makrophagen induzieren⁸⁴, es kann zur Anlagerung und eventuell Denaturierung von Proteinen kommen^{113,116}, wodurch wiederum Makrophagen aktiviert

werden¹¹⁶. Zudem kann Implantatdetritus toxische Wirkung entfalten^{5,113}. Außerdem spielen mechanische Faktoren wie Stabilität und geometrische Faktoren wie die Oberflächenform, Poren- und Partikelgröße eine Rolle^{5,83,113}.

Individuelle Faktoren wie Alter, Geschlecht, Immunstatus und systemische Medikamentenwirkung können die Reaktion des Körpers auf implantierte Biomaterialien ebenfalls mit beeinflussen⁷⁶, ebenso früherer Kontakt mit dem implantierten Material (Polymere, Silikon)⁹⁸. Die Biokompatibilität ist somit auch als ein individuelles Geschehen zu werten⁵.

Durch Wechselwirkungen zwischen Gewebe und Material können die einzelnen Faktoren in ihrem Einfluss variieren, was in der Biotechnologie genutzt wird. So gelingt es, durch Oberflächenbehandlung mit Polyethylenoxid die Anlagerung von Proteinen und Zellen zu verringern und so die Interleukin-4 und Riesenzellbildung zu reduzieren, was als „Passivierung“ bezeichnet wird¹²¹.

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Experimente wurden 25 adulte, weibliche Weiße Alpenschafe verwendet, welche zwischen 47 und 70 kg wogen. Das anhand der Zähne ermittelte Alter lag zwischen 1,5 und 5 Jahren. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn einer Ankaufsuntersuchung unterzogen, so dass nur gesunde, gut genährte und nicht trächtige Tiere ausgewählt wurden.

Die Genehmigungen für die Durchführung der Tierversuche wurden von der Kantonalen Tierversuchskommission des Bundesamtes für Veterinärwesen, Veterinäramt Zürich, erteilt (Bewilligungsnummern 147/1999, 139/2000, 81/2001, 176/2003, 188/2004, 90/2005 und 135/2006).

3.1.1 Präoperative Versorgung der Tiere

Bei allen Tieren wurde eine Behandlung gegen Endo- und Ektoparasiten (Dectomax[®], Wirkstoff Doramectin, 10mg/50kg KGW, Pfizer AG, Zürich, Schweiz) vorgenommen und eine sterile Blutprobe mittels Vacutainer System (Becton Dickinson, Plymouth, GB) zur Untersuchung auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen das Maedi / Visna Virus entnommen. Die serologische Untersuchung erfolgte am virologischen Institut der Vetsuisse Fakultät der Universität Bern. Des Weiteren wurden die Klauen im Rahmen der Ankaufsuntersuchung und ggf. vor der Operation geschnitten. Alle Schafe erhielten projektbezogene Ohrmarken (Firma Allflex Europe, Hamburg, Deutschland) und subkutane Transponder (Datamars SA, Bedano-Lugano, Schweiz) zur Identifizierung.

Die Haltung der Versuchstiere erfolgte in einem Laufstall (Gruppenhaltung) mit täglichem Weidegang in den Monaten April bis Oktober. Postoperativ erfolgte die Aufstallung in Separationsboxen zu zwei bis drei Tieren derselben Studie, ein Teil der Tiere durfte nach 14 Tagen wieder auf die Weide.

Am Tag vor der Operation wurden die Tiere gewogen und im OP-Bereich geschoren. Anschließend wurden sie in eine mit Sägespänen eingestreute Box verbracht, wo sie Wasser ad libitum, jedoch kein Futter erhielten.

3.1.2 Operationen

3.1.2.1 Vorbereitung und Prämedikation

Vor dem Eingriff wurden die Tiere klinisch untersucht. Dabei wurden Puls, Atmung und Temperatur gemessen, Lunge und Pansen auskultiert, sowie Schleimhautfarbe, kapilläre Rückfüllzeit und Füllung der Episkleralgefäße beurteilt und eine Stauprobe an der Vena jugularis vorgenommen. Anamnestisch erfolgte die Beurteilung von Appetit und Kotabsatz. Die Befunde wurden schriftlich festgehalten. Anschließend wurden die Tiere mit Medetomidin i.m. (Domitor[®], 0,005mg/kg KGW, Gräub AG Bern, Schweiz) und Buprenorphin i.m. (Temgesic[®], 0,01mg/kg KGW, Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) prämediziert.

Etwa 20 Minuten später wurden die Haut im Bereich des Venenzugangs geschoren, mittels Hibiscrub[™]-Seife (Zeneca AG, Luzern, Schweiz) gesäubert und anschließend durch eine 70% Alkohollösung und Hibitane[™]-Tinktur (Zeneca AG, Luzern, Schweiz) entfettet und desinfiziert. Der Venenzugang (Vygonüle S G14, Vygon GmbH, Aachen, Deutschland) wurde in der Vena jugularis gelegt, mittels IN-Stopper (Braun Melsungen AG, Deutschland) verschlossen und der Katheter angenäht (Supramid 2/0, Aesculap AG& Co, Tuttlingen, Deutschland). Als Infektionsprophylaxe erhielten die Tiere vor Beginn des operativen Eingriffs Benzylpenicillin i.v. (Penicillin G Hoechst, 30.000 I.E./kg KGW, Hoechst AG, Deutschland), Gentamicin i.v. (Vetagent[®], 6mg/kg KGW, Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) und equines Tetanusserum s.c. (Tetanus-Serum Intervet, 500 I.E./ Tier, Vertrieb Veterinaria AG, Zürich, Schweiz). Zur Analgesie wurde Carprofen i.v. (Rimadyl[®], 4mg/kg KGW, Pfizer AG, Schweiz) gegeben.

3.1.2.2 Narkose

Zur Narkoseeinleitung erhielten die Tiere Ketamin i.v. (Narketan10[®], 2mg/kg KGW, Vetoquinol AG, Bern, Schweiz) und Diazepam i.v. (Valium[®], 0,1mg/kg KGW, Fa. Roche Pharma AG, Reinach, Schweiz). Anschließend wurde das jeweilige Schaf nach Einbringen eines lokalanästhetischen Sprays auf die Stimmritze (Xylocain[®] Spray10%, Astra Pharmaceutica AG) endotracheal intubiert und auf dem Operationstisch gelagert. Ein Isofluran-Sauerstoff-Gemisch (Forene[®], Abbott AG, Stans, Schweiz) diente zur Aufrechterhaltung der Narkose mittels Inhalation.

3.1.2.3 Operationsdurchführung

Die Haut der vier Operationsgebiete wurde analog zur Vorbereitung des Venenzugangs gereinigt, entfettet und desinfiziert.

Der Zugang erfolgte dabei jeweils von lateral, d.h. im Bereich des Humerus proximal über dem Tuberculum majus und distal dem Epicondylus lateralis humeri und im Bereich des Femurs proximal über dem Trochanter major und distal des Condylus lateralis femoris. Nach dem Hautschnitt von ca. 5 cm Länge wurde das Gewebe bis auf den Knochen frei präpariert.

Die Übersicht über die Zugänge zu den Applikationsorten ist auf Abbildung 1 zu sehen.

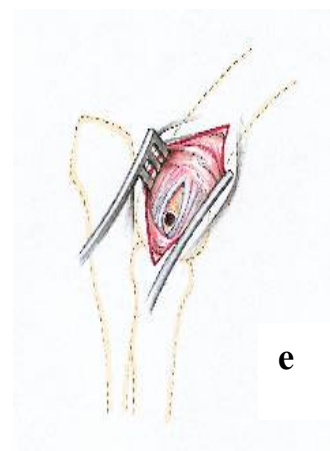
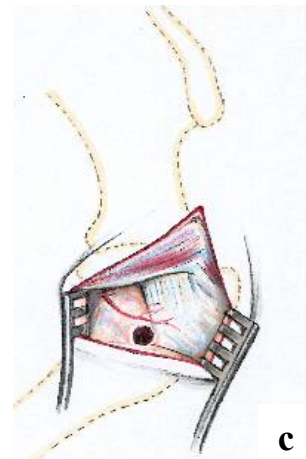
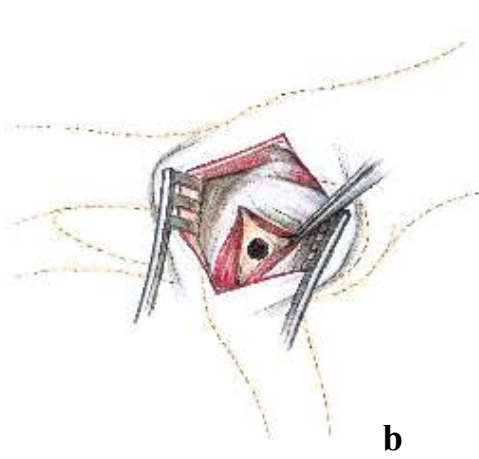
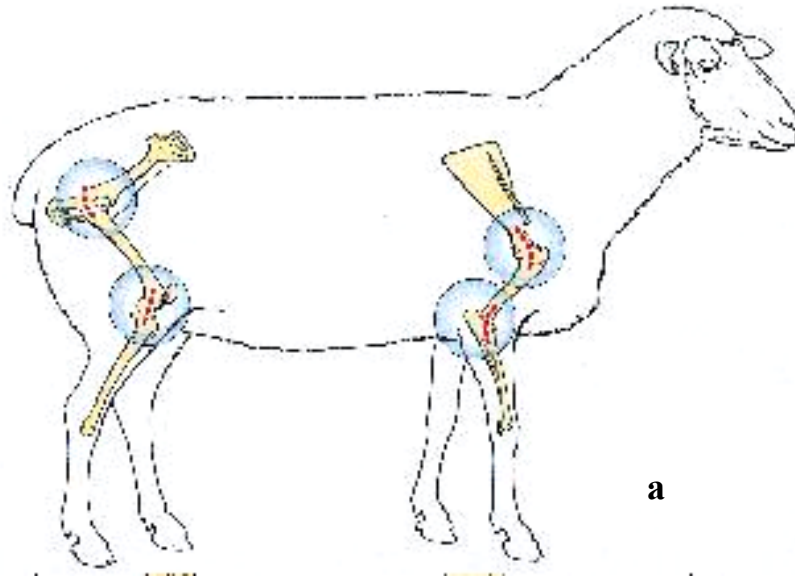


Abb. 1: Übersicht über die Zugänge zu den Applikationsorten

a: Lokalisationen der Zugänge, rote Linie: Schnittführung, b: Lokalisation des Bohrlochs am proximalen Femur, c: Lokalisation des Bohrlochs am proximalen Humerus, d: Lokalisation des Bohrlochs am distalen Femur, e: Lokalisation des Bohrlochs am distalen Humerus

(Aus: Nuss KMR, Auer JA, Boos A, von Rechenberg B. An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials cancellous bone, *BMC Musculoskeletal Disord*, 2006, 7:67)

Die standardisierten Bohrlochdefekte⁷⁷ wurden senkrecht zur Knochenachse unter Verwendung einer Bohrschablone und einer druckluftbetriebenen Bohrmaschine (Synthes®, Oberdorf, Schweiz) gesetzt. Das zylindrische Bohrloch wies einen Durchmesser von 8 mm und eine Tiefe von 13 mm auf. Gewebereste und Knochenmehl wurden gründlich entfernt, bevor anschließend das entsprechend dem Versuchsaufbau vorgesehene steril vorbereitete Biomaterial eingesetzt wurde. Abschließend erfolgte eine schichtweise Adaptation der Wundränder mit fortlaufender Naht und resorbierbarem Nahtmaterial (Dexon® II 2/0, Bi-Color, Virbac AG, Schweiz). Die Haut wurde mittels Skin-Stapler (Auto-Suture®, AG, Schweiz) verschlossen und darüber ein steriler Tupfer angebracht. Durch das Setzen der Bohrlochdefekte in allen vier Gliedmaßen war eine intraoperative Umlagerung erforderlich.

3.1.3 Postoperative Versorgung der Tiere

Postoperativ wurden die Tiere über vier Tage mit zwei Mal täglich Benzylpenicillin i.v. (Penicillin G Hoechst, 30.000 I.E./kg KGW Hoechst AG, Deutschland) und Gentamicin i.v. (Gentamicin, 6mg/kg KGW, Streuli & Co, Schweiz) antibiotisch versorgt und erhielten ebenfalls zwei mal täglich das Analgetikum Carprofen i.v. (Rimadyl®, 4 mg/kg KGW, Pfizer, Schweiz). Am zweiten Tag post OP wurde die Decknaht entfernt, am vierten Tag post OP der Venenkatheter und am 10. Tag post OP die Klammern über den Hautwunden.

Die Unterbringung der Tiere erfolgte in mit Stroh eingestreuten Boxen, in Kleingruppen zu je zwei bis drei Tieren derselben Versuchsgruppe. Heu und Wasser wurden ad libitum zur Verfügung gestellt.

3.2 Verwendete Knochenersatzmaterialien

3.2.1 Hydrogele

Es kamen 18 verschiedene Hydrogele zum Einsatz, deren Zusammensetzung sich im Trägerstoff und in den verschiedenen Zusätzen unterschied.

Die Bezeichnung „S“ bezeichnet im Folgenden einen Träger synthetischer, die Bezeichnung „F“ einen Träger fibriner Herkunft.

Insgesamt wurden 10 verschiedene Träger auf Fibrin-Basis (H1- H10) und 8 verschiedene Träger auf Polyethylenbasis (H11- H18) verwendet.

Die intraoperative Zubereitung erfolgte durch die Vermischung zweier Komponenten in einer sterilen Doppelspritze. Dabei wurden bei Hydrogelen auf Fibrinbasis Fibrinogen und Thrombin, bei Hydrogelen auf synthetischer Basis Polyethylenglycol (PEG)-Thiol und PEG-Acrylat miteinander vermengt.

Den Hydrogelen wurden in einigen Versuchen Mediatoren (Bone Morphogenetic Protein (BMP), Tumor Growth Factor β (TGF- β) und Parathormon (PTH)) bzw. ein jodhaltiges Kontrastmittel (Iohexal) und / oder Thrombin in unterschiedlicher Dosierung zugesetzt, jedoch unterliegen die näheren Angaben dem Patentrecht (Kuros Biosurgery[®], Zürich, Schweiz) und können nicht näher ausgeführt werden. Die Verteilung der Hydrogele je nach Trägerstoff, Zusatz und Lokalisation ist der Tabelle im Anhang zu entnehmen (Tab. 1).

3.2.2 Kalzium-Phosphat Verbindungen

Die Zemente wurden jeweils direkt vor dem Einbringen in das Bohrloch steril entsprechend der Herstellerangaben vermengt. Dazu wurde das jeweilige sog. Mixing-Kit verwendet, in dem die flüssige Komponente (Natrium-Hyaluronsäure) in einen mit der festen Komponente (Zementpulver bzw. Kalziumsulfat) befüllten Beutel injiziert wurde. Der Beutel wurde daraufhin in einen dafür entwickelten Mixer platziert und der Inhalt nach gründlicher Durchmischung in eine Applikationsspritze gepresst. Aus dieser wurde das jeweilige Bohrloch befüllt.

Ausnahme hiervon bilden die Proben der Schafe Nr. 864-866, bei denen vorgefertigte Blöcke, sog. Preset- Materialien, verwendet wurden.

Die angewandten Materialien je Schaf und Lokalisation sind der Tabelle im Anhang zu entnehmen (Tab. 2).

3.2.2.1 Brushite-Zement

Es wurden 12,57 g Zementpulver (chronOSTM - Inject, ohne Granula (Mathys Medical und Stratec Medical, Schweiz)) mit 4,75 ml steriler Natriumhyaluronatlösung 0,5% (Vitrolife UK Ltd., Edinburgh, Schottland) wie bei 3.2.2 beschrieben vermengt.

3.2.2.2 Brushite-Zement „X-9“

Die Zusammensetzung dieses Zementes ähnelt der von chronOSTM-Inject, jedoch wurde hier zusätzlich 5% Calciumpyrophosphat zugegeben, um die Aushärtungszeit zu verlängern. Es wurden 3,35g Puder pro ml Hyaluronsäure (Vitrolife UK Ltd, Edinburgh, Schottland) verwendet.

3.2.2.3 chronOSTM - Inject

Hierzu wurden in einer Mischkartusche 32g steriles Zementpulver (42% β - TCP Pulver, 31% β -TCP Granula, 21% Monocalciumphosphatmonohydrat, 5% Magnesiumhydrogenphosphattrihydrat, <1% Dinatriumhydrogenpyrophosphat und Magnesiumsulfat) (Mathys Medical und Stratec Medical, Bettlach, Schweiz) mit 10 ml einer sterilen Natriumhyaluronatlösung (0,5 %) (Vitrolife UK Ltd, Edinburgh, Schottland) vermengt und für 60 Sekunden mittels Rührteiler vermischt. Das Resultat war eine Brushite-Matrix, die β -TCP-Granula mit einer Partikelgröße von < 0,5 mm enthielt und eine Porosität von ca. 35 % aufwies. Sie konnte mit einer Applikationspistole in das entsprechende Bohrloch eingebracht werden.

3.2.2.4 Norian Reinforced[®]

Hierbei handelt es sich um eine patentrechtlich geschützte Zusammensetzung (Norian Corp., Cupertino, USA) von 8,77 g sterilem Zementpulver, bestehend aus α -TCP, Kalziumkarbonat, Monokalziumphosphat Monohydrat und synthetischen Fasern, die mit einer flüssigen Komponente zu einer Paste vermengt wurde.

3.2.2.5 Biobon[®]

Ein Gemisch aus Kalzium- und Phosphatsalzen wurde nach Herstellerangabe (Biomet Merck, Berlin, Deutschland) durch Zugabe einer sterilen Kochsalzlösung im zugehörigen Ballon durch Kneten mit der Hand für 2 Minuten vermengt. Die Applikation erfolgte aus diesem Ballon oder nach Umfüllung in eine sterile Spritze.

3.2.2.6 Kalziumsulfathemihydrat (CSH)

Zur Herstellung des „Plaster of Paris“ wurden 15 g Kalziumsulfat Hemihydrat Pulver mit 4,12g einer entsprechenden Kalziumsulfatlösung (Synthes Bettlach GmbH, Bettlach, Schweiz) vermischt.

3.2.2.7 Blöcke aus β -Tricalciumphosphat (β - TCP)

Hier kamen vorgefertigte Blöcke (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz) zum Einsatz, die aus α -Tricalciumphosphat und Tricalciumphosphat unter Zusatz von Paraffinöl und Natriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4) gefertigt worden waren. Durch Rühren über 45 Sekunden war eine Zementpaste mit je nach Menge des zugesetzten Paraffins (0,017, 0,14, 0,3, 0,57 g/L) unterschiedlich großen Öltröpfchen hergestellt worden. Nach einer Inkubation von 24 Stunden zur Aushärtung des Materials wurde durch ein Reinigungsverfahren mit Petroleumether das Paraffin wieder heraus gewaschen und die Blöcke anschließend auf 1250 °C erhitzt. Hierdurch entstand das reine β -TCP mit Porengrößen von 150 μm , 260 μm , 510 μm und 1220 μm , welches in Form von sterilen Zylindern mit 8 mm Durchmesser und 13 mm Länge in die entsprechenden Bohrlöcher eingebracht wurde. Die Porosität betrug ca. 75 %.

3.2.3 Seide

Es kamen vorgefertigte Blöcke zum Einsatz, die aus Seidenfasern natürlichen Ursprungs (Seidenraupe *Bombyx mori*) hergestellt wurden. Dabei wurden in unterschiedlichen Verfahren mit Hilfe von Paraffin oder Salz Poren in die dreidimensionalen Seidenmatrices eingebracht. Sowohl das Paraffin als auch das Salz wurden im Rahmen des

Herstellungsprozesses wieder extrahiert. Die in die entsprechende Größe geschnittenen Blöcke wurden steril verpackt und autoklaviert.

Zum Einsatz kamen je zwei Seidenmatrices aus zwei Herstellungsprozessen: Jeweils auf der Basis von Paraffin- bzw. Salzporen wurden Seidenmatrices aus den USA (Tufts University, Massachusetts, USA, Seide aus Japan) und der Schweiz (Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (ETHZ), Schweiz, Seide aus China: Trudel Inc., Zürich, Schweiz) verglichen.

Tabelle 3 im Anhang gibt Auskunft über die Verteilung der unterschiedlichen Seidenmatrices in den jeweiligen Bohrlöchern.

3.3 Gewinnung der Proben

Die Schafe wurden acht Wochen nach der Operation am Isolierschlachthof des Tierspitals der Universität Zürich geschlachtet. Eine Ausnahme bilden hierfür die Tiere mit der Nummer 864-866, welche bereits sechs Wochen post operationem geschlachtet wurden, weil diese Proben im Rahmen einer weiteren Studie unter anderen Gesichtspunkten untersucht werden sollten. Es wurden jeweils beide Humeri und Femora bzw. bei den Schafen der Nummer 864-866 die Tibiae entnommen und von Haut, Muskulatur und anhaftendem Bindegewebe befreit. Anschließend wurden Röntgenaufnahmen (Faxitron[®] X-ray System, Hewlett and Packard, Oregon, USA) der Knochen in mediolateraler und caudocranialer Richtung und mit einer Belichtung von 50 KV, 3 mA und 1 sec angefertigt.

Es wurde für die makroskopische Beurteilung ein Knochenblock von 15 mm Kantenlänge mittels Knochensäge (Exakt[®], Bandsystem 300/310 mit Präzisionsparallelführung 300 CP/ 310 CP, Apparatebau GmbH Norderstedt, Deutschland) aus dem frei präparierten Humerus bzw. Femur entnommen. Die Schnittführung erfolgte dabei parallel zur Längsachse des gefüllten Bohrkanals (Abb. 2).

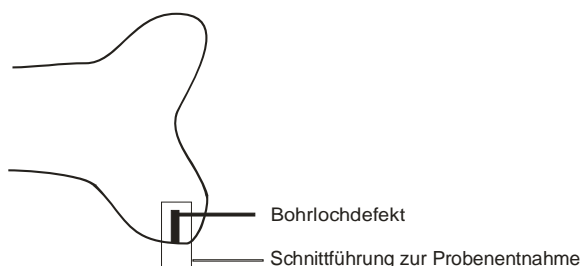


Abb. 2: Gewinnung der Proben für die histologische Untersuchung

3.4 Aufbereitung der Proben für die histologische Untersuchung

Von den gewonnenen Proben wurden für die quantitative Histologie zur histomorphometrischen Beurteilung der Zementresorption und des Knochenzuwachses Dickschnittpräparate angefertigt. Zur histologischen Beurteilung des Zellvorkommens und der Zellverteilung wurden gefärbte Dünnschnittpräparate hergestellt.

3.4.1 Herstellung der Dickschnittpräparate

Nach der Fixierung der Knochenblöcke in einer 4 % gepufferten Formalin-Lösung (Verhältnis der Probe zur Lösung 1:10) für die Dauer von sieben Tagen wurden die Proben mit Leitungswasser für 3 mal 30 min ausgewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 % Alkohol für 3 x 30 Minuten, 70 % Alkohol für 2 x 12 Stunden, 80 % Alkohol 2 x 12 Stunden, 90 % Alkohol 1 x 12 Stunden, 96 % Alkohol 1 x 12 Stunden, 100 % Alkohol 4 x 12 Stunden) entwässert. Xylol wurde zur Entfettung der Proben verwendet (1 x 12 Stunden, anschließend 3 Tage im Vakuum), bevor die Proben mit flüssigem Methylmetacrylat (MMA, Leica[®] HistoDur, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) infiltriert wurden. Während des Einbettungsvorganges wurden die Proben in einem evakuierten Behälter bei 4 °C für die Dauer von 7 Tagen aufbewahrt. Das verwendete Methylmetacrylat wurde vor der Verwendung frisch aus 89,5 % Methacrylsäuremethylester (Fluka Chemie, Buchs, Schweiz), 0,5 % Perkadox 16 (Dr. Grogg Chemie, Stetteln, Schweiz) und 10 % Dibutylphthalat (Fa. Merck, Hohenbrunn, Deutschland) angerührt und 20 Minuten lang vermischt. Das Auspolymerisieren dauerte 4 Tage.

Die Probeblöcke wurden in speziell angefertigte Teflonformen (Sulzer Biologics, Winterthur, Schweiz) gelegt und mit Metacrylat überschichtet. Der Verschluss erfolgte durch aufschraubbare Stahlplättchen. Zur Aushärtung wurden die Proben für 24 Stunden in einem Wasserbad (Thermomix B, Fa. Bender Hohbein) bei 32,7 °C inkubiert und anschließend 12 Stunden unter dem Abzug entlüftet. Mittels Historesin-Kleber (Histotresin[®], Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland, Historesin mounting 7022 im Verhältnis 2:1 mit Historesin Medium vermennt) wurden die Probeblöcke auf Plastikaufsätze geklebt, um sie in der Sägevorrichtung fixieren zu können.

Dickschnitte von 400 µm wurden mit Hilfe einer Innenlochsäge (Leica[®] SP 1600, Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) angefertigt, mittels Cementit[®] Kunststoffkleber (CAR, Merz und Benteli Ag, Niederwangen, Schweiz) auf einer Acrylglasplatte

(Akropalobjektträger: Perspex GS Acrylicglas Opal 1013, Fa. Wachendorf) befestigt und mit der Schleifmaschine (Struers[®], Planopol- V 401, Struers A/S, Rodovre, Dänemark) auf die Enddicke von 30-40 µm geschliffen. Die Oberflächenfärbung erfolgte anschließend mit Toluidinblau.

3.4.2 Herstellung der Dünnschnittpräparate

Für die histologische Untersuchung wurden aus den Probenblöcken mit Hilfe eines Schnittmikrotoms (Leica[®] Typ 2500, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) Dünnschnitte von 5 µm Dicke angefertigt, auf einen mit Chromalaun-Gelatine beschichteten Objektträger aufgezogen und mit Kisolfolie (Haska AG Bern, Schweiz) abgedeckt. Nach Trocknung im Wärmeschränk bei 42 °C über 2 Tage wurden die Schnitte mit Toluidinblau und mit von Kossa / McNeal gefärbt (Abb. 3).

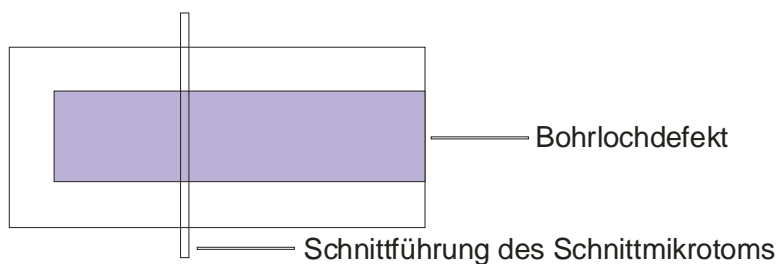


Abb. 3: Anfertigung der Dünnschnitte

3.4.3 Toluidinblau-Färbung

Die Dünnschnitte wurden zunächst in einem Bad aus (2-Methoxyethyl)-Acetat (MEA, Merck 8.06061.1000, Merck GmbH, Darmstadt, Deutschland) drei mal über 30 Minuten bei Raumtemperatur entplastet und anschließend entfettet durch zwei mal 5 Minuten Baden in Xylol und Spülung mit einer absteigenden Alkoholreihe (2 x mit 100 % Alkohol, 2 x 96 % Alkohol, 1 x 70 % Alkohol). Es folgte ein leichtes „Anätzen“ mit 0,7 % Ameisensäure für zwei mal 2 Minuten, danach wurden die Proben vorsichtig trocken getupft. Zur Färbung wurde die 0,1 % Toluidinblau-Gebrauchslösung aus 5ml Stocklösung (1 g Toluidinblau O, Fluka 89640 in 100 ml Aqua entionisiert) und 45 ml Phosphatpufferlösung (0,2 mol / l Na_2HPO_4 und 0,2 mol / l NaH_2PO_4) mit pH 8,0 filtriert und auf 60°C erwärmt. Nach zehn Minuten Einwirkzeit wurde die Färbelösung mit Leitungswasser und entionisiertem Wasser

abgespült und die Dünnschnitte vorsichtig trocken getupft und luftgetrocknet. Abschließend wurden die Proben kurz in Xylol gestellt und mit Shandon-Mount (Toluene base, Shandon 1900333, Histocom AG Zug, Schweiz) eingedeckt.

3.4.4 Von Kossa-Färbung mit McNeal Tetrachrom Gegenfärbung

Die Präparate wurden wie oben beschrieben entplastet und durch zwei mal 3 Minuten Tauchen in Xylol und anschließendes kurzes Tauchen in eine absteigende Alkoholreihe (2 x Ethanol 100 %, 2 x Ethanol 96 %, 1 x Ethanol 70 %) und ein abschließendes kurzes Tauchen in entionisiertes Wasser (3 x) entfettet. Im Anschluss daran erfolgte in drei Färbeschritten die Färbung nach von Kossa. Dazu wurden die Präparate eine Stunde an hellem Licht mit einer Lösung von 5 g Silbernitrat in 100 ml entionisiertem Wasser gebadet, mit entionisiertem Wasser gespült und anschließend 5 Minuten in einer Lösung aus 5 g Natriumhydrogencarbonat in 25 ml Formaldehydlösung 37 % und 75 ml Aqua entionisiert getaucht. Nach einer weiteren Spülung unter fließendem Leitungswasser wurden die Proben für 5 Minuten einer Lösung aus 5 g Natriumthiosulfat in 100 ml Aqua entionisiert ausgesetzt und wiederum mit Leitungswasser gespült. Die Gegenfärbung nach McNeal erfolgte unter Einwirkung einer 5 % Gebrauchslösung aus 0,5 g Methylenblau-Chlorid, 0,8 g Azur-A-Eosinat, 0,1 g Methylenviolett in je 250 ml Methanol und Glycerin. Dazu wurde die Lösung 12 Stunden bei 50 °C und anschließend bei 37 °C über 3 Tage stehen gelassen und zur Gebrauchslösung mit destilliertem Wasser auf 5 % verdünnt. Die abschließenden Schritte umfassten hier wie oben nach dem Lufttrocknen ein einmaliges Tauchen in Xylol und ein Eindecken mit Shandon Mount (s. o.).

3.5 Beurteilung der histologischen Präparate

Für die vorliegende Studie wurden Dünnschnitte der Präparate von 25 Schafen mit je acht Bohrlöchern untersucht, so dass 200 Lokalisationen für die histologische Beurteilung herangezogen werden konnten.

Die Beurteilung der histologischen Präparate erfolgte mit einem Mikroskop (Leica® MDL 505097, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) mit Objektiven der 10- bis 40fachen Vergrößerung. Zusätzlich wurden mit Hilfe einer digitalen Kamera (Leica® DC100, Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) Aufnahmen angefertigt. Die Auswertung

erfolgte bei 400facher Vergrößerung in vier Zonen je histologischen Präparates, wobei aus jeder Zone zwei Gesichtsfelder quantitativ beurteilt wurden (Abb. 4).

Zone 1 entsprach dabei dem Zentrum des Bohrloches (bzw. Fremdmaterials), Zone 2 der Mitte des Bohrloches, Zone 3 dem Übergang zwischen Bohrloch und altem Knochen, Zone 4 dem alten Knochen.

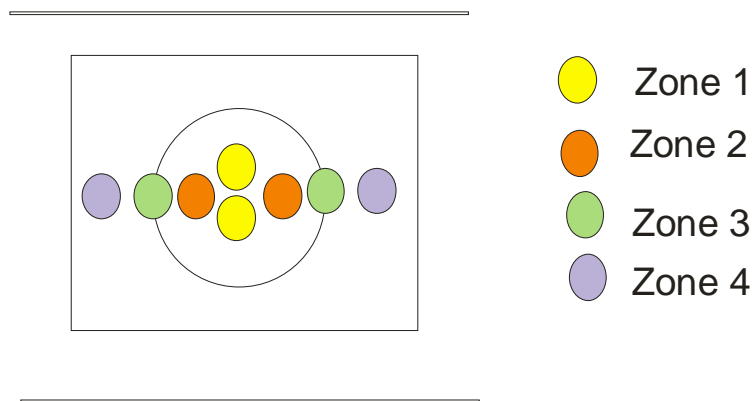


Abb. 4: Auswahl der Zonen bei der histologischen Untersuchung

Bei der Toluidinblau-Färbung erscheint die mineralisierte Hartgewebematrix ungefärbt bis blassblau, während sich Zellen, Zellkerne, Osteoidsäume und Kollagenfasern unterschiedlich blau anfärben lassen. Knorpelmatrix und Mastzellgranula erscheinen metachromatisch violett, die verkalkte Knochenmatrix kräftig dunkelblau.

In der Färbung nach von Kossa kommt es durch die Versilberung von Kalziumsalzen zu einer kontrastreichen Schwärzung der mineralisierten, d. h. kalziumphosphathaltigen Gewebeanteile. Durch die Gegenfärbung nach MacNeal erscheinen Zellkerne dunkelblau, Zytoplasma und Osteoidsäume türkis-blau.

Zur Beurteilung herangezogen wurde unter Verwendung der mit Toluidinblau gefärbten Dünnschnittpräparate die relative Verteilung der mehrkernigen Riesenzellen, der Makrophagen, der Lymphozyten und der Plasmazellen. In Einzelfällen wurde auf die Dünnschnitte mit der Färbung nach von Kossa / MacNeal zurückgegriffen, um die kalziumphosphathaltigen Phagozyten zu identifizieren. In jedem Gesichtsfeld wurde die relative Verteilung der Zelltypen in Bezug auf die Gesamtzahl der Zellen bewertet. Dabei wurden mehrkernige Riesenzellen entsprechend der Anzahl ihrer Nuclei gewertet.

Die Menge des verbliebenen Fremdmaterials im Bohrloch, die Bildung neuen Knochens, sowie das Vorhandensein einer möglichen bindegewebigen Kapselbildung wurden deskriptiv erfasst.

3.5.1 Lichtmikroskopische Charakterisierung der quantitativ ausgewerteten Zelltypen in der Toluidinblau- Färbung

3.5.1.1 Makrophagen

Makrophagen sind den mehrkernigen Riesenzellen im Hinblick auf die Zytoplasmaeinschlüsse sehr ähnlich. Sie sind jedoch wesentlich kleiner (meist 12-25 µm) und besitzen nur einen Nucleus. Sie liegen teilweise im lockeren Bindegewebe, aber auch direkt am Fremdmaterial an. Das phagozytierte Fremdmaterial bestimmt das Aussehen der Makrophagen wesentlich und lässt Rückschlüsse auf das eingesetzte Material zu.

Im Fall der Hydrogele erscheint das Zytoplasma daher schaumig-blasig voller glasig schimmernder hellgrauer bis hellblauer Einschlüsse, die je nach Schnittebene den Nucleus vollständig überdecken (Abb. 5). Im Fall von Zement sind die Einschlüsse dunkler und größer, zum Teil unregelmäßig kantig geformt (Abb. 6). Durch die Einschlüsse ist das Erkennen der Zellgrenzen teilweise schlecht möglich, weshalb hier auch die Färbung nach von Kossa / McNeal zur Abklärung herangezogen wurde. In den Seidenpräparaten zeigt sich das Zytoplasma der Makrophagen einheitlich mittelblau, Einschlüsse sind unregelmäßig hellblau gefärbt, der Nucleus ist gut abgrenzbar und besitzt einen dunkelblauen Saum (Abb. 7).

3.5.1.2 Mehrkernige Riesenzellen

Während Lymphozyten und Plasmazellen bei den hier untersuchten Präparaten ein einheitliches Aussehen zeigen, variiert das Aussehen der mehrkernigen Riesenzellen und Makrophagen in Abhängigkeit des eingesetzten Biomaterials. Durch die Phagozytose zeigt das Zytoplasma je nach verwendetem Material ein anderes Aussehen. Bei Präparaten, in denen Hydrogele zum Einsatz kamen, zeigt sich das Zytoplasma hellblau und schaumig mit glasigen, hellblauen bis leicht gräulich schimmernden Granula. Die dunklen, kleinen, rundlichen Nuclei (meist 2 - 20) weisen einen dunkelblauen Saum auf. Die Anordnung der Kerne ist unregelmäßig, teils randständig in Gruppen, teils randständig hufeisenförmig, dabei kommen beide Formen nebeneinander vor (Abb. 8).

In den Präparaten der Kalziumphosphat-Verbindungen ist das Zytoplasma einheitlich mittelblau gefärbt und die Nuclei heben sich davon nur durch ihre dunklere Kernmembran

und fleckiges Aussehen (durch angefärbtes Chromatin) ab und sind etwa zwei bis drei Mal so groß wie bei den Riesenzellen, die im Zusammenhang mit Hydrogelen gefunden werden (Abb. 9). Die Nuclei (3 - 10) liegen verstreut im Zytoplasma, welches nur zum Teil sichtbare Einschlüsse zeigt. Diese sind je nach Zementzusammensetzung glasig-gräulich bis homogen mittelblau und unregelmäßig, zum Teil kantig geformt. Insgesamt ähneln die mehrkernigen Riesenzellen, die bei Zementen gefunden werden, in ihrem Aussehen stark den Osteoklasten, mit dem Unterschied, dass sie frei oder an der Zementmasse liegend gefunden werden. Dabei weisen sie einen kleinen Abstand zur Zementoberfläche auf, während Osteoklasten der mineralisierten Substanz direkt anliegen.

Die mehrkernigen Riesenzellen der Seidenpräparate sind deutlich größer ($\geq 100 \mu\text{m}$) als die der anderen Präparate und weisen meist über 10 und bis 30 Nuclei auf. Das Zytoplasma ist hier hellblau, meist gleichmäßig, manchmal etwas wolzig gefärbt und enthält keine abgrenzbaren Granula. Die Nuclei sind gut abgrenzbar, klein und rund und besitzen einen dunkelblau gefärbten Saum und dunkelblau fleckig gefärbtes Chromatin. Die Kerne liegen überwiegend in Gruppen zusammen, teilweise hufeisenförmig an der der Seide abgewandten Seite der Zelle (Abb. 10).

3.5.1.3 Lymphozyten

Bei den Lymphozyten handelt es sich um kleine Zellen mit einem Durchmesser von 6-8 μm , die durch einen einheitlich dunkelblau bis schwarz erscheinenden kreisrunden Nucleus gekennzeichnet sind. Der Nucleus ist von einem schmalen, mittelblauen Zytoplasmasaum umgeben, wodurch die Zellen rund erscheinen. Diese Zellen finden sich einzeln oder auch in größeren Ansammlungen frei im lockeren Bindegewebe liegend (Abb. 11).

2.5.1.4 Plasmazellen

Plasmazellen besitzen einen runden, dunkelblau bis schwarz erscheinenden Nucleus, wie bei den Lymphozyten ist kein Nucleolus abgrenzbar (Abb. 12). Das mittel- bis dunkelblaue Zytoplasma umgibt den exzentrisch liegenden Nucleus, so dass die Zellen oval erscheinen und einen Längsdurchmesser von ca. 14-18 μm aufweisen. Plasmazellen liegen im Kollagenfasernetz des Bindegewebes und kommen überwiegend vereinzelt vor.

2.5.1.5 Fibroblasten und Fibrozyten

Fibroblasten stellen sich als mittelblaue längliche Zellen dar. Ihr Zellkern ist dunkelblau gefärbt, flach oval und erstreckt sich fast über die gesamte Zelllänge. Aus ihnen werden die reifen spindelförmigen Fibrozyten mit einer Länge von ca. 50 µm, die von Bindegewebsfasern umgeben sind und nur noch einen schmalen mittelblauen Zytoplasmasaum aufweisen, der den oval bis einseitig abgeplatteten dunkelblauen Nucleus umschließt. Fibrozyten liegen in der Regel in kleinen Gruppen zusammen im Fasernetz eingeschlossen, während Fibroblasten einzeln im lockeren Bindegewebe vorkommen.

Reifes Bindegewebe, das gerichtete, „fischzug-artige“ Fibrozyten aufweist, die als Saum das Fremdmaterial umgeben und so eine Barriere zwischen Fremdmaterial und Knochensubstanz bilden, wird als Kapsel bezeichnet. In dieses dichte Netz von Kollagenfasern mit länglichen Fibroblasten und spindelförmigen Fibrozyten sind zum Teil in Nestern angeordnete Lymphozyten und Plasmazellen eingelagert.

3.6 Statistische Auswertung

Beurteilt wurden 200 histologische Präparate, die von 25 Schafen mit je 8 Bohrlochdefekten gewonnen werden konnten. Zur Beurteilung herangezogen wurden 96 Lokalisationen, in den Hydrogele eingesetzt wurden, davon 67 mit Fibrin und 29 mit Polyethylenglykol als Trägerstoff. An 24 Präparaten wurde der Einsatz von β -TCP-Keramiken untersucht, an 30 Lokalisationen die Verwendung eines Brushite-Zementes und an 14 Schnitten der Einsatz von Hydroxyapatit-Zementen. Bei 6 Lokalisationen wurde Kalziumsulfathemihydrat eingesetzt. Jeweils 12 Bohrlöcher von Seidenmatrices mit Poren auf Salz- bzw. Paraffinbasis wurden zur Untersuchung herangezogen. Weitere 6 Bohrlöcher blieben als Leerkontrolle ohne eingebrachtes Fremdmaterial.

Die Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen wurden anhand der ermittelten relativen Verteilung pro Gesichtsfeld und Zone doppelt gezählt und der Mittelwert davon tabellarisch erfasst. Die statistische Auswertung erfolgte mittels eines Computerprogrammes (SPSS® Base für Mac OS X, Version 13.0, Chicago, Illinois, USA). Für die Korrelationen zwischen den Zellarten wurde der Spearman Test verwendet.

4 Resultate

4.1 Operationsdurchführung und postoperative Phase

Alle Operationen konnten wie geplant durchgeführt werden, allerdings traten bei einzelnen Tieren im Operationsverlauf kleinere Komplikationen auf. So ist in einigen Fällen durch die Bohrung in die distale Epiphyse des Humerus die Gelenkkapsel des Ellbogengelenkes mit eröffnet worden. Dadurch ist es bei einem Teil der mit Hydrogel gefüllten Bohrlöcher zu einem Austritt des Gels gekommen, was jedoch erst post mortem, beim Anfertigen der Knochenpräparate auffiel. Klinische Veränderungen (wie Schwellungen, Lahmheit) wurden dabei bis zum Zeitpunkt der Schlachtung nicht bemerkt.

In anderen Fällen kam es trotz Verwendung einer Bohrhülse zu Schwierigkeiten beim Ansetzen der Bohrerspitze auf den distalen Humerus bzw. Femur. In wenigen Fällen rutschte die Bohrerspitze von der Knochenoberfläche ab bzw. konnte die geplante Richtung des Bohrloches nicht eingehalten werden. Es konnten jedoch sämtliche Bohrungen in spongiösen Knochen gesetzt werden.

Das Herstellen der Zemente und das Einbringen in den Bohrkanal gelang mithilfe der Applikationsspritze problemlos. Kleine Mengen Blut im Bohrkanal konnten trotz sorgfältigen Tupfens nicht vermieden werden, diese wurden jedoch durch den Zement verdrängt, ohne dass es zu einer Vermischung mit diesem kam. Die Aushärtungszeit der Zemente variierte je nach Material. Kalziumsulfat härtete dabei am schnellsten aus (2 - 3 Minuten) und Norian Reinforced® am langsamsten (13 - 15 Minuten). Das Verbringen der vorgefertigten Seidenscaffolds in das Bohrloch gelang komplikationslos.

Beim abschließenden Wundverschluss, dem Anbringen der Decknähte und in der Aufwachphase traten keine Komplikationen auf, so dass die Tiere wie geplant in ihren Stall zurück transportiert werden konnten.

Alle Schafe erholten sich rasch von der Narkose und konnten die Gliedmaßen anschließend voll belasten. Auch die tägliche klinische Kontrolle im Anschluss an die Operation zeigte nur in wenigen Fällen lokale Schwellungen, die als kleine Hämatome bzw. Serome diagnostiziert wurden und sich ohne weitere Therapie innerhalb weniger Tage spontan zurückbildeten. Sämtliche Tiere konnten nach dem vorgesehenen Zeitraum geschlachtet werden.

4.2 Probengewinnung und –aufbereitung

Die Probengewinnung und –aufbereitung wurde unter standardisierten Bedingungen ausgeführt. Von den 200 angefertigten Dünnschnittpräparaten konnten 14 nicht ausgewertet werden, da die Probengewinnung bzw. -aufbereitung fehlerhaft war. Aufgrund der guten Heilungstendenz war es mitunter schwierig, den gefüllten Bohrkanal acht Wochen nach der Implantation des Knochenersatzmaterials als solchen ausfindig zu machen. Dadurch kam es in Einzelfällen zu fehlerhafter Schnittführung mit der Knochensäge. Proben, in denen der Defekt nur unzureichend dargestellt war, wurden daher nicht in die histologische Auswertung einbezogen. In einem Teil der mit Hydroxyapatit gefüllten Lokalisationen kam es bei der Anfertigung der Dünnschnitte zu einem Herauslösen des kaum resorbierten Fremdmaterials. Daher konnten die Präparate der Kalziumphosphatverbindung Nr. 1, 2, 4 und 5 nicht für alle Zonen bzw. alle Zelltypen zur Beurteilung herangezogen werden.

4.3 Histologische Beurteilung der Präparate

In dieser Studie wurden insgesamt 200 Dünnschnitte histologisch untersucht. Hierzu wurden die aus je acht Lokalisationen gewonnenen Proben von 25 Schafen in der Toluidinblau-Färbung bei 400facher Vergrößerung mikroskopiert.

4.3.1 Hydrogele

Es wurden 87 Schnitte aus der Hydrogelgruppe ausgewertet.

4.3.1.1 Hydrogele auf der Basis von Fibrin (Schaf Nr. 2404 – 2409)

In dieser Studie wurden Hydrogele auf der Basis von Fibrin eingesetzt, denen in unterschiedlicher Zusammensetzung Parathormon, Iohexal und / oder Thrombin zugesetzt worden war.

Im Zentrum (Zone1) überwog lockeres Bindegewebe, welches je nach eingebrachtem Material Cluster von Lymphozyten und Makrophagen aufwies. Je reicher das Bindegewebe an kollagenen Fasern war, desto weniger Lymphozyten und Makrophagen kamen in dieser Zone vor. Auffallend waren kleine helle zytoplasmatische Einschlüsse phagozytierten

Materials in den Makrophagen, die dadurch ein schaumig-blasiges Aussehen erhielten. Plasmazellen lagen vereinzelt im lockeren Bindegewebe. In einzelnen Proben fanden sich Hydrogelreste, die von mehrkernigen Riesenzellen mit vielen (5 - 9) kleinen Nuclei und hellem Zytoplasma gesäumt wurden (Abb.12). Auffallend war hier das Vorkommen kleiner Blutgefäße im Zentrum bei einem überwiegenden Anteil der Präparate.

Auch in Zone 2 dominierte Bindegewebe mit eingelagerten Lymphozyten und Makrophagen, Plasmazellen kamen hier nur sehr vereinzelt vor. In einigen Proben fanden sich überwiegend Fettzellen in lockerem Bindegewebe und in den Proben mit dichtem kollagenem Bindegewebe im Zentrum desmale Ossifikation. Hydrogelreste wurden in Zone 2 überwiegend bereits nicht mehr nachgewiesen.

Der Übergang zu Zone 3 bestand in wenigen Proben aus einer dünnen Bindegewebsschicht mit zirkulärem Faserverlauf, eine dichte Bindegewebsgrenze im Sinne einer Kapselbildung konnte in fünf Fällen nachgewiesen werden.

Neu gebildeter Knochen durch meist desmale, teilweise auch enchondrale Ossifikation, beherrschte das Bild in Zone 3. Im Bindegewebe zwischen den neu gebildeten Knochenstrukturen wurden zahlreiche Makrophagen, aber nur wenige Lymphozyten angetroffen. Die Makrophagen waren einerseits mit schaumig-blasigen, hellen Vakuolen, andererseits auch mit Hämosiderin gefüllt. Plasmazellen traten nur noch vereinzelt auf. Am Rand einiger Defekte fanden sich Osteoklasten mit ein bis drei Nuclei und dunklem Zytoplasma in kleinen Gruppen, die an ausgereifter Knochensubstanz lagen.

In Zone 4 fand sich regelmäßig eine mäßige Anzahl an Osteoklasten, überwiegend im Bereich von Schaltlamellen. Am Rand des bei wenigen Schnitten aktivierten Knochenmarks fand sich eine geringe Anzahl Makrophagen.

Insgesamt erfolgte der Abbau des Hydrogels in den hier beurteilten Präparaten in fast allen Fällen innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 8 Wochen. Lagen noch kleine Reste Hydrogel vor, so waren sie von Fremdkörperriesenzellen umschlossen. Im Bindegewebe, das den Defekt zentral ausfüllte, lagen Makrophagen und Lymphozyten sowie vereinzelte Plasmazellen. Während in Zone 3 ein breiter Saum von neuem Knochen entstanden war, wurden in Zone 4 bereits regelmäßig Osteoklasten angetroffen.

4.3.1.2 Hydrogele auf Basis von Fibrin und Polyethylenglykol, teilweise mit Zusätzen (Schaf Nr. 1204 – 1209)

Bei dieser Studie wurden die Bohrlochdefekte mit Hydrogelen unterschiedlicher Zusammensetzung gefüllt. Zum Einsatz kamen dabei synthetische und fibrinhaltige Trägersysteme, denen variable Mediatorkomponenten mit Bone Morphogenic Protein (BMP) oder Parathormon (PTH) zugesetzt wurden.

Ein Teil der Schnitte konnte auf Grund von technisch bedingten Artefakten nicht ausgewertet werden. In anderen Proben, überwiegend in den Fällen, in denen ein synthetisches Hydrogel zum Einsatz kam, waren größere Mengen des injizierten Materials verblieben, so dass hier keine Zellen angetroffen wurden. Mehrkernige Riesenzellen konnten in der unmittelbaren Umgebung des Fremdmaterials nur vereinzelt nachgewiesen werden. In dem Anteil der Proben, in dem Bindegewebe in Zone 1 anstelle des eingebrachten Biomaterials lag, waren vor allem Makrophagen und Lymphozyten nachweisbar. Letztere lagen mitunter in Clustern vor, die bis zu 70% des Gesichtsfeldes (bei 400facher Vergrößerung) ausmachten (Abb. 13).

Zone 2 ließ einen signifikanten Unterschied in der Zellverteilung erkennen: In denjenigen Proben, in denen im Zentrum Fremdmaterial dominierte, fanden sich hier lockere Ansammlungen von sehr großen Fremdkörperriesenzellen mit bis zu 15 kleinen Nuclei, deren Zytoplasma voller kleiner glasig-klar erscheinender Einschlüsse war. Im Aussehen glichen diese mehrkernigen Riesenzellen dabei den ebenfalls zahlreich vorkommenden Makrophagen, deren Zytoplasma die gleichen Einschlüsse aufwies.

Fand sich hingegen Bindegewebe im Zentrum, so waren auch in Zone 2 regelmäßig Makrophagen und wenige Lymphozyten in Bindegewebe eingelagert. In einzelnen Präparaten fand sich neuer Knochen, in zwei Präparaten konnten Knorpelzellen nachgewiesen werden.

In Zone 3 dominierten Makrophagen, während mehrkernige Riesenzellen nur noch vereinzelt angetroffen wurden. Desmale Ossifikation bestimmte bei einem Teil der Präparate das Bild, hier fehlten Lymphozyten und Makrophagen. Plasmazellen wurden in dieser Zone vergleichsweise häufig, jedoch jeweils nur in einer geringen Anzahl, angetroffen.

Im Bereich des alten Knochens (Zone 4) kamen nur noch vereinzelte Lymphozyten vor, Plasmazellen fehlten in fast allen Schnitten. Makrophagen mit deutlich erkennbarem phagozytiertem Fremdmaterial und Osteoklasten waren regelmäßig zu sehen.

Beim Abbau des Hydrogels wurden zahlreiche Makrophagen und zum Teil auch mehrkernige Riesenzellen angetroffen, die Fremdmaterial phagozytiert hatten. Ein Unterschied in der Zellreaktion konnte beim Zusatz von BMP bzw. PTH in dieser Studie nicht beobachtet

werden. Vor allem der Abbau der synthetischen Trägersubstanzen war nach 8 Wochen noch nicht abgeschlossen, Zone 1 war teilweise noch vollständig mit Fremdmaterial gefüllt, hier wurden vermehrt Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen beobachtet. Lymphozyten und Plasmazellen waren überwiegend im Zentrum anzutreffen. Die Bildung einer bindegewebigen Kapsel wurde in keinem Fall beobachtet, dagegen war in allen Proben ein breiter Saum neuen Knochens gebildet worden.

4.3.1.3 Zusammenfassung der Zellverteilung beim Einsatz von Hydrogelen

Wie Tabelle 7 zu entnehmen, konnten in den Zonen des Bohrloches (1 - 3) durchschnittlich 10-12 % Makrophagen pro Gesichtsfeld (alle Werte beziehen sich auf die 400fache Vergrößerung) gezählt werden. Die Häufigkeitsgipfel schwankten je nach eingesetztem Material, wofür die Resorptionsgeschwindigkeit und Zusammensetzung entscheidend waren. Die höchsten Werte erreichte mit 35 % Makrophagen pro Gesichtsfeld in Zone II das Hydrogel H12, welches sich in der Histologie als schwer abbaubar zeigte und noch große Restmengen Hydrogel im Bohrlochkanal aufwies. In der Peripherie (Zone 4) nahm die Anzahl an Makrophagen bei allen Hydrogelproben stark ab, durchschnittlich wurden 5,9 % Zellen pro Gesichtsfeld gezählt. Mehrkernige Riesenzellen konnten bis zu 5 % pro Gesichtsfeld nachgewiesen werden (Tabelle 6), hier lag das Maximum in Zone 1 und 2. Durchschnittlich wurden in Zone 1 1,09 %, in Zone 2 1,75 %, in Zone 3 0,76 % und in Zone 4 noch 0,67 % mehrkernige Riesenzellen pro Gesichtsfeld beim Einsatz von Hydrogel gefunden. Hydrogel Nr. 8 wies mit 5,83 % die höchsten gefundenen Werte in Zone 1 auf, jedoch waren hier in den weiteren Zonen nur unter 0,5 % mehrkernige Riesenzellen nachgewiesen worden.

Lymphozyten wurden durchschnittlich 6,8 % pro Gesichtsfeld in Zone 1, 5,6 % in Zone 2 und 2,9 % in Zone 3 und nur 0,6 % in Zone 4 nachgewiesen.

Höhere Lymphozytenwerte wiesen hingegen die Hydrogele H 2, H6, H 8, H12 und H18 auf. Die höchsten Werte zeigte das Hydrogel H 8, welches im Durchschnitt einen Maximalwert von 19,61 % in Zone 2 erreichte und selbst in Zone 4 noch durchschnittlich 10,83 % Lymphozyten pro Gesichtsfeld aufwies. Die Hydrogele mit Lymphozytenwerten über 5 % in den Zonen 1-3 zeigten auch die höchsten Makrophagenzahlen (vgl. Grafik 1 und 4). Plasmazellen wurden durchschnittlich stets unter 1 % der Zellen pro Gesichtsfeld

nachgewiesen, lediglich H 12 wies mit 2,5 % pro Gesichtsfeld überdurchschnittlich viele Plasmazellen in Zone 1 auf.

Zur statistischen Auswertung wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman (Spearman's Rho (abgekürzt mit dem griechischen Minuskel ρ)) berechnet (siehe Tabelle 8 im Anhang).

Dabei zeigten sich positive Korrelationen zwischen Lymphozyten und Plasmazellen in den Zonen 1 ($\rho = 0,644$), 2 ($\rho = 0,389$) und 4 ($\rho = 0,523$) bei einem Signifikanzniveau von $p=0,01$ (zweiseitig). Die Lymphozyten und Riesenzellen waren nur in Zone 1 positiv miteinander korreliert ($\rho = 0,344$) bei einem Signifikanzniveau von $p=0,01$ (zweiseitig). Lymphozyten und Makrophagen korrelierten auf einem Signifikanzniveau von $p=0,01$ (zweiseitig) in Zone 1 ($\rho = 0,530$) und Zone 2 ($\rho = 0,389$).

4.3.2 Kalziumphosphat-Verbindungen

Es wurden 71 Schnitte aus der Kalziumphosphat-Gruppe ausgewertet.

4.3.2 .1 Kalziumphosphat verschiedener Porengröße (Schaf Nr. 864 – 866)

In diesen Proben kam Kalziumphosphatzement zum Einsatz, dem β -TCP-Granula in vier verschiedenen Porengrößen beigemischt war. Die Porengröße hatte erheblichen Einfluss auf die Zellverteilung und Resorptionsrate, denn in den Präparaten mit Porendurchmessern von 1220 μm war zum Zeitpunkt der Untersuchung (6 Wochen post operationem) in Zone 1 nur noch ein sehr geringer Zementrest im Rahmen der histologischen Untersuchung nachweisbar. Im dichten Bindegewebe fanden sich einige Makrophagen, wenige Lymphozyten und nur vereinzelte Plasmazellen. Bei den kleineren Porendurchmessern fanden sich Zementreste, welche als hell- bis dunkelviolette Netzstrukturen erkennbar waren. Um diese herum fanden sich Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen, wobei beide dunkle zytoplasmatische Einschlüsse unterschiedlicher Größe aufwiesen. Unabhängig davon fand bei einigen Proben in unmittelbarer Nachbarschaft von Zementresten die Bildung von neuem Knochen statt.

In Zone 2 dominierten Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen, und zwar unabhängig von dem Vorkommen dieses Zelltyps im Zentrum. Lymphozyten und Plasmazellen kamen kaum noch vor.

Zone 3 zeigte neben neuem Knochen überwiegend Makrophagen mit dunklen Granula, hier kamen jedoch keine mehrkernigen Riesenzellen mehr vor.

Während in Zone 3 keine mehrkernigen Riesenzellen anzutreffen waren, fanden sie sich neben reichlich Makrophagen in der Zone des alten Knochens. Die Riesenzellen glichen im Aussehen der Granula den Makrophagen und waren von den in Lakunen gelegenen Osteoklasten gut abzugrenzen.

Je nach Porengröße war unterschiedlich viel Bindegewebe im Zentrum anzutreffen, bei großen Poren fanden sich keine Zementreste mehr. Die Resorption des Zementes erfolgte durch Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen, wobei letztere ein homogenes Zytoplasma aufwiesen. Die Riesenzellen besaßen wenige (meist 2 - 4) große Nuclei.

4.3.2.2 Kalziumphosphat-Zemente unterschiedlicher Zusammensetzung, Kalziumsulfat (Schaf Nr. 2501 – 2503)

Diese Studie wurde mit Brushite Zement mit und ohne β -TCP-Granula, Kalziumsulfat und Norian Reinforced[®] durchgeführt. Zone 1 wies in einem Großteil der Proben nur Zementreste (Norian Reinforced[®]) ohne beurteilbare Zellen auf und fehlte durch Artefaktbildung (Herauslösen während des Schneidevorgangs) in den restlichen Präparaten. In wenigen Schnitten lag Bindegewebe mit wenigen Lymphozyten und einigen Makrophagen vor. In Zone 2 konnte häufig nur ein schmaler Saum von Zellen zur Beurteilung herangezogen werden, in ihm fanden sich einige Makrophagen und wenige Lymphozyten. Plasmazellen und mehrkernige Riesenzellen kamen dagegen nicht vor. Auch hier war in vielen Präparaten durch Zementreste oder Schnittartefakte die Beurteilung nicht möglich. Die Zone 3 zeigte sich hier als schmaler Saum neu gebildeten Osteoids am Rand des Defekts, wo sich einzelne Makrophagen und Lymphozyten fanden (Abb. 14). Zone 4 erschien äußerst zellarm, nur vereinzelt traten Makrophagen oder Osteoklasten in Erscheinung, in einem Präparat fand sich aktiviertes Knochenmark. Die langsam resorbierbaren Zementzusammensetzungen waren nach 8 Wochen noch nicht abgebaut, nur am Rand des Defekts fanden sich phagozytierende Makrophagen und einzelne Osteoklasten. Beim Einsatz des schnell resorbierbaren Kalziumsulfates war das Bohrloch mit überwiegend lockerem Bindegewebe gefüllt. Der alte Knochen umschloss das Bohrloch (bis auf ein Präparat, s. o.) reaktionslos.

4.3.2.3 Kalziumphosphat-Zemente (Schaf Nr. 804, 806)

In dieser Studie wurden Kalziumphosphatzemente unterschiedlicher Zusammensetzung und der kommerzielle Zement Norian[®]SRS eingesetzt.

Zone 1 war im überwiegenden Teil der Präparate durch Herauslösen des Gewebes / Biomaterials während des Schneidevorgangs leer und damit nicht beurteilbar. In den intakten Schnitten fand sich dichtes Bindegewebe mit zahlreichen Makrophagen, deren Zytoplasma voller dunkler Granula war. Mehrkernige Riesenzellen traten nicht auf. Auffallend war eine Insel neu gebildeten Knochens im Zentrum des Defektes, der mit Norian[®] SRS gefüllt worden war. Zone 2 wies neben reichlich Makrophagen auch regelmäßig vermehrt Lymphozyten auf, die teilweise in Clustern zusammen lagen. In dieser Zone konnten vereinzelt mehrkernige Riesenzellen nachgewiesen werden. In der Peripherie des Defektes (Zone 3) fanden sich insgesamt weniger inflammatorische Zellen, vor allem Makrophagen sowie einige Lymphozyten und vereinzelt mehrkernige Riesenzellen. Im Bereich außerhalb des Bohrlochs (Zone 4) konnten nur noch einzelne Makrophagen, Lymphozyten und Osteoklasten aufgefunden werden.

Die Präparate dieser Studie erwiesen sich als insgesamt zellarm, wobei Makrophagen das Geschehen dominierten.

4.3.2.4 Kalziumphosphat-Zemente (Schaf Nr. 839, 842)

Bei dieser Versuchsreihe wurden die Bohrlochdefekte mit Brushite- und Hydroxyapatit-Zement aufgefüllt.

Im Zentrum war bei der Hälfte der Präparate (Verwendung von Hydroxyapatit) ausschließlich Zementmasse zu erkennen, in den anderen Schnitten lag zellarmes Bindegewebe mit einigen Makrophagen und wenigen Lymphozyten vor. In zwei Präparaten kamen im Zentrum reichlich mehrkernige Riesenzellen vor, die sich im lockeren Bindegewebe um Zementreste gelagert hatten. Im einen Fall erschien die Reaktion aufgrund zirkulär angeordneter Lymphozytenanhäufungen granulomatös. In zwei anderen Fällen lagen im Zentrum auch kleine Inseln neuen Knochens (Abb. 15). Ein Teil der o. g. zementreichen Präparate wies auch in Zone 2 keine Zellen auf, ansonsten fanden sich neben Makrophagen regelmäßig mehrkernige Riesenzellen und Lymphozyten. Plasmazellen traten nur vereinzelt in Erscheinung. In Zone 3 waren Makrophagen regelmäßig anzutreffen und in der überwiegenden Anzahl der Präparate fanden sich zudem einige mehrkernige Riesenzellen und wenige Lymphozyten. Der Bereich des alten Knochens (Zone 4) war überwiegend zellarm, Lymphozyten und Plasmazellen wurden nicht beobachtet und es traten nur einige Makrophagen und vereinzelt Osteoklasten auf.

Die hier verwendeten Zemente wurden überwiegend durch Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen abgebaut, dabei wurde die unterschiedliche Abbaubarkeit der beiden Zemente deutlich. Es kam bei den Brushite-Zementen z. T. bereits zu Knochenneubildung im Zentrum, während in den Hydroxyapatit-Schnitten Zone 1 und 2 ausschließlich das Knochenersatzmaterial zeigten. Bis auf einen granulomartigen Aufbau spielten Lymphozyten und Plasmazellen eine untergeordnete Rolle.

4.3.2.5 Zusammenfassung der Zellverteilung beim Einsatz von Kalziumphosphat-Verbindungen

Die histologischen Präparate der Brushite-Zemente erwiesen sich als sehr zellarm, durch Materialreste bzw. Herauslösen des Materials waren zudem die Zone 1 und teilweise auch die anderen Zonen hinsichtlich der Zellverteilung nicht beurteilbar. Es fanden sich zwischen 3,3 % (Zone 1) und 0,48 % (Zone 4) Lymphozyten, nur vereinzelt mehrkernige Riesenzellen (unter 0,5 %) und Plasmazellen bis 1,3 % pro Gesichtsfeld. ChronOS™ Inject (CaP 3) und Biobon® (CaP 6) zeigten durchschnittlich 9,2 – 13,3 % bzw. 3,5 – 6,7 % Makrophagen pro Gesichtsfeld in Zone 1-3 (vgl. Tab. 7), in der Peripherie (Zone 4) wurden nur 2,8 % bzw. 0,7 % gefunden. Mehrkernige Riesenzellen fanden sich bei ChronOS™ Inject in geringer Anzahl, maximal in Zone 2 (2,55 % pro Gesichtsfeld), bei Biobon® maximal in Zone 1 (5,3 % pro Gesichtsfeld).

Norian® (CaP 5) wurde im Zeitraum von 8 Wochen nur sehr wenig resorbiert und zeigte daher starke Artefaktbildung durch Herauslösen, am Rand des Bohrlochdefekts konnten die beurteilten Zelltypen nur selten (Maximum 5 % Lymphozyten in Zone 1) nachgewiesen werden.

Kalziumsulfat (CaP 7) war nach 8 Wochen nahezu vollständig durch Makrophagen resorbiert worden. Es fanden sich als Maximum 15 % Makrophagen pro Gesichtsfeld in Zone 2 (Zone 1 6,7 %, Zone 3 7 %, Zone 4 1,8 %), ansonsten konnten die übrigen Zelltypen nur sehr vereinzelt (bis 1,2 %) nachgewiesen werden.

Die β -TCP-Keramiken zeigten konstante Makrophagen-Werte zwischen 4 bis 10 % pro Gesichtsfeld in den Zonen 1- 4 (durchschnittlich in Zone 1 6,8 %, in Zone 2 8,1 %, in Zone 3 8,2 %, Zone 4 5,9 %), mehrkernige Riesenzellen wurden regelmäßig in geringer Anzahl (1-3 %) nachgewiesen, Lymphozyten unter 4 % in abnehmender Tendenz nach peripher (dort <1 %), Plasmazellen wurden in allen Zonen in weniger als 1 % der Zellen pro Gesichtsfeld gefunden (Ausnahme CaP 10, dort in Zone 1 1,35 %).

Die statistische Auswertung anhand des Spearman Tests (siehe Tabelle 9 im Anhang) ergab für Lymphozyten und Plasmazellen positive Korrelationen in Zone 1 ($\rho = 0,856$), Zone 2 ($\rho = 0,694$), Zone 3 ($\rho = 0,581$) und Zone 4 ($\rho = 0,407$) bei einem Signifikanzniveau von 0,01 (zweiseitig). Bei einem Signifikanzniveau von 0,01 (zweiseitig) korrelieren Lymphozyten und Riesenzellen nur in Zone 3 ($\rho = 0,457$), Lymphozyten und Makrophagen in Zone 2 ($\rho = 0,358$), Zone 3 (0,463) und Zone 4 (0,460).

4.3.3 Seide

Es wurden 22 Schnitte aus der Seiden-Gruppe ausgewertet.

4.3.3.1 Seiden verschiedener Herstellungsart und Porengröße (Schaf Nr. 3101 – 3103)

Hier gelangten Seidenmatrices zum Einsatz, die verschiedene Porengrößen besaßen. Die Poren wurden unter der Verwendung von Salz (Natriumchlorid) oder Paraffin in die homogene Matrix eingebracht.

Im Zentrum (Zone1) häuften sich mehrkernige Riesenzellen, die die noch vorhandenen Seidenreste vollständig umschlossen. Dabei wiesen die mehrkernigen Riesenzellen ein nur schwach angefärbtes Zytoplasma auf, in dem Vakuolen oder Granula kaum abzugrenzen waren (Abb. 16). Die bis zu 25 Nuclei lagen dabei linear, haufenweise oder hufeisenförmig im Zytoplasma benachbarter Riesenzellen. Eine Regelmäßigkeit in der Anordnung der Nuclei war dabei nicht erkennbar. In den verbliebenen Seidenresten war zum Teil eine streifige Struktur erkennbar, die sich in der Kossa - Färbung als Mineralisation herausstellte. Die mehrkernigen Riesenzellen schienen Löcher in die Seide zu „schmelzen“.

Je nach Porengröße fand sich mehr oder weniger lockeres Bindegewebe zwischen den Seidenresten, darin lagen Makrophagen und wenige Lymphozyten, Plasmazellen kamen nur sehr vereinzelt vor. In einigen Schnitten konnte im Zentrum neugebildete Knochensubstanz nachgewiesen werden.

Auch in Zone 2 zeigten sich reichlich mehrkernige Riesenzellen um die verbliebenen Seidenreste, darum Makrophagen und hier weniger Lymphozyten. Die Seidenreste in Zone 2 waren dabei kleiner als diejenigen in Zone 1, so dass im Überblick eine deutliche Zersetzung von außen nach innen deutlich wurde.

Auffallend in 15 von 22 Präparaten war eine dünne bindegewebige, zirkulär angeordnete Schicht im Übergang von Zone 2 und 3, in die regelmäßig lokale Ansammlungen von

Plasmazellen eingelagert waren. Seidenreste waren in diesen Schnitten nicht außerhalb dieser Grenze zu finden. In Zone 3 erfolgte zentripetal ausgerichtetes Knochenwachstum, vereinzelt fanden sich daneben von mehrkernigen Riesenzellen umschlossene kleine Seidenreste sowie reichlich Makrophagen.

Zone 4 erwies sich als sehr zellarm, es fanden sich nur noch wenige Makrophagen und Lymphozyten, jedoch keine mehrkernigen Riesenzellen. In der Peripherie waren einzelne Osteoklasten anzutreffen.

4.3.3.2 Zusammenfassung der Zellverteilung beim Einsatz von Seiden

Es fanden sich ähnlich den Werten bei den Hydrogelen 6-12 % Makrophagen pro Gesichtsfeld in Zone 1-3, wobei der Gipfel (durchschnittlich 10,6 %) in Zone 2 lag. In Zone 4 kamen nur noch 1,6-3,1 % (durchschnittlich 2,7 %) Makrophagen pro Gesichtsfeld vor (Tabelle 7). Die mit deutlichem Abstand höchsten Werte für die mehrkernigen Riesenzellen zeigten in dieser Studie die Seiden, die Werte von 32,5 % (S2) und 16,87 % (S1) in Zone 1 erreichten, bei einem Durchschnitt von 26,6 % Zellen pro Gesichtsfeld (Tab.6). Bei allen Seidenpräparaten erfolgte ein deutlicher Abfall zur Peripherie hin: Zone 2 durchschnittlich 18,1 %, Zone 3 5,1 %, Zone 4 0,1 %. Der Vergleich mit der Leerkontrolle zeigte, dass die Zahl an mehrkernigen Riesenzellen in Zone 2 150-320fach erhöht war (Grafik 5). Bereits in Zone 3 sank der Faktor auf das 5-10fache, in der Peripherie waren mehrkernige Riesenzellen sogar weniger häufig nachweisbar als in der Leerkontrolle (Grafik 5). Für die Lymphozyten konnten in Zone 1 und 2 ebenfalls sehr hohe Werte nachgewiesen werden (Tabelle 4), durchschnittlich wurden 19,8 % Lymphozyten pro Gesichtsfeld in Zone 1 und 18,6 % in Zone 2 gezählt, wobei die höchsten Werte das Material S 4 erzielte (32,59 % in Zone 1, 43,75 % in Zone 2). Zur Peripherie hin sanken die Werte deutlich auf durchschnittlich 7,8 % in Zone 3 und 0,25 % in Zone 4. Plasmazellen wurden zwar absolut häufiger gesehen, jedoch lagen die ermittelten Werte in den vier Zonen bei der relativen Bewertung pro Gesichtsfeld immer unter 2 %.

Der Spearman Test zeigte für die Seidenpräparate nur wenige signifikante Korrelationen auf dem 0,01 Niveau (zweiseitig)(siehe Tabelle 10 im Anhang): jeweils in Zone 3 korrelierten positiv Lymphozyten und Plasmazellen ($p = 0,591$), Lymphozyten und Riesenzellen ($p = 0,632$) und Makrophagen und Riesenzellen ($p = 0,561$).

4.3.4 Leerkontrollen

Es wurden 6 Schnitte der Leerkontrollen ausgewertet.

Die Leerkontrollen zeigten überwiegend lockeres Bindegewebe im Bereich des Bohrloches, von der Peripherie her wurde neuer Knochen angelagert. Zum Teil fanden sich auch Inseln mit neuer Knochensubstanz im Bindegewebe. Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen wurden nur vereinzelt angetroffen, nur in einem Fall (Schaf Nr. 842, Humerus rechts proximal) fanden sich vermehrt Lymphozyten (10 %) und Makrophagen (20 %) in Zone 1. Bei diesem Präparat wurde auch außerhalb des Bohrloches ein leicht erhöhtes Zellvorkommen (5 % Lymphozyten und Plasmazellen, 3 % Makrophagen und 7,5 % mehrkernige Riesenzellen) beobachtet.

Die Auswertung des Spearman Tests (Tabelle 11 im Anhang) zeigte nur bei Riesenzellen und Makrophagen in Zone 4 ($p = 1,0$) eine signifikante Korrelation auf dem 0,01 Niveau (zweiseitig).

4.4 Statistische Auswertung

Von den 200 Dünnschnitten konnten 186 (93%) Schnitte semiquantitativ ausgewertet werden, die übrigen 14 Präparate waren wegen fehlerhafter Schnittführung oder Artefaktbildung nicht beurteilbar.

In der vorliegenden Arbeit kamen 11 Kalziumphosphat-Verbindungen, 18 Hydrogele und 4 Seidenpräparate zum Einsatz, wobei jedes Material an unterschiedlichen Lokalisationen und meist mehreren Individuen eingesetzt wurde. Ausnahme hierbei bilden die Hydrogele Nr. 11, 15 und 17, die jeweils nur in einem Bohrloch eingesetzt und daher zur statistischen Auswertung nur für den Spearman Test herangezogen wurden. Als Leerkontrolle dienten 6 Lokalisationen.

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der einzelnen Zelltypen je nach Material und Region (Zone 1- 4) sind den Tabellen 4-7 zu entnehmen, die grafischen Darstellungen der Zellverteilung (Mittelwerte) finden sich in Grafik 1- 4 im Anhang.

Die Korrelationen der einzelnen Zelltypen nach dem Spearman Test lassen sich der Tabelle 8 im Anhang entnehmen. Dabei wurden die Materialien für die Korrelationsanalyse in die drei Gruppen Hydrogele, Kalziumphosphat-Verbindungen, Seiden zusammengefasst.

5 Diskussion

5.1 Ziel der Studie

In der vorliegenden Studie sollte anhand der Beurteilung histologischer Präparate die zelluläre Reaktion auf die Implantation resorbierbarer Knochenersatzmaterialien beurteilt werden. Hierzu kamen verschiedene Materialien aus der Gruppe der Kalziumphosphat-Verbindungen, Hydrogele und Seiden zum Einsatz, die im Bohrlochmodell 6 bzw. 8 Wochen post operationem mit den Ergebnissen der Leerkontrollen verglichen wurden. Die histologischen Ergebnisse ließen erkennen, durch welche Zellen das jeweilige Material abgebaut wird und bestätigten charakteristische Zellverteilungen, insbesondere hinsichtlich Vorkommen und Aussehen der mehrkernigen Riesenzellen. Durch die gewonnenen Erkenntnisse konnte den verschiedenen Knochenersatzmaterialien eine gute Biokompatibilität bestätigt werden. Wiederholt konnte die Bildung neuen Knochens in unmittelbarer Nähe zu mehrkernigen Riesenzellen beobachtet werden.

Das Auftreten der mehrkernigen Riesenzellen war nur in seltenen Fällen mit dem Vorkommen von Lymphozyten und Plasmazellen korreliert, so dass davon auszugehen ist, dass die mehrkernigen Riesenzellen als physiologisch für den Abbau großmolekularer Substanzen (Seiden, z. T. Hydrogele) anzusehen sind.

5.2 Wahl eines geeigneten Versuchsmodells

5.2.1 Tiermodell

Versuche an Schafen haben sich in der Forschung der Frakturheilung und der Knochenersatzmaterialien seit Jahren bewährt^{20,21,38,58,77,78}.

Schafe haben einen dem Menschen makroskopisch ähnlichen Aufbau der großen Röhrenknochen¹²² und auch der Knochenregenerationsprozess ist zwischen adulten Schafen und Menschen vergleichbar⁷⁸. Dagegen hat man bei Ratten und Kaninchen aufgrund der wesentlich höheren Stoffwechselrate eine ca. dreifach schnellere Knochenneubildung festgestellt⁵⁴. Des Weiteren sind Schafe aufgrund ihres Körpergewichtes dem Menschen

ähnlich, auf die artifiziellen Frakturen kommt daher eine vergleichbare Belastung zu, was Rückschlüsse auf die zu erwartende mechanischer Stabilität ermöglicht. Da Schafe in der Regel postoperativ die Gliedmaße spontan belasten, stellt auch eine mangelnde knöcherne Durchbauung infolge Nichtbelastung kein Problem dar⁷⁶.

Eine Schafherde ist gut unter standardisierten Bedingungen zu halten, dabei gewährleistet die Auswahl von weiblichen Schafen derselben Altersgruppe ein harmonisches Gruppenbild in Bezug auf Größe und Gewicht. Es wurden daher ausschließlich weibliche Schafe zu den Versuchen herangezogen, um eine einheitliche Population in Hinblick auf Knochenstruktur und Stoffwechselleistung zu erhalten. Bei der Auswahl der Versuchstiere ist zudem zu beachten, dass gerade die Frakturheilung altersabhängig verläuft: bei juvenilen Tieren kommt es zu einer rascheren Knochenheilung⁷⁶. Zur Altersbestimmung kann dabei der radiologische Nachweis von geschlossenen Wachstumsfugen⁷⁶ dienen, in der vorliegenden Arbeit wurde das Alter anhand des Zahnwechsels geschätzt. Wie sich in der histologischen Untersuchung zeigte, konnten dabei vereinzelt noch aktive Wachstumsfugen nachgewiesen werden. Die Genauigkeit der Zahnaltersschätzung ist daher fraglich. Eine Verfälschung der vorliegenden Ergebnisse durch die Ungenauigkeit der Altersschätzung ist jedoch aufgrund der Anzahl der Versuchstiere unwahrscheinlich.

5.2.2 Versuchsmodell

Zur Bestimmung der Biokompatibilität einer Substanz sind Untersuchungen *in vitro* und *in vivo* erforderlich. Nach Toxizitätsstudien an Zellkulturen folgen zur Bestimmung der Biokompatibilität, die nur im lebenden Organismus getestet werden kann⁷⁸, in der Regel Studien an Ratten oder Mäusen, denen die zu prüfenden Substanzen subkutan oder in die Bauchwand eingesetzt werden^{25,87,88,89}. Nur wenn diese Ergebnisse erfolgreich sind, werden weitere Versuche durchgeführt. Im Rahmen der Knochenersatzmaterialien hat sich das sog. Bohrlochmodell (Drill hole) zur Überprüfung der Biokompatibilität als gut geeignet herauskristallisiert⁷⁷. Da während einer Allgemeinnarkose an bis zu acht Lokalisationen verschiedene Fremdmaterialien eingebracht werden kann, können individuelle Störungen des Heilungsverlaufes gut abgegrenzt und zudem die Anzahl der statistisch erforderlichen Versuchstiere minimiert werden⁷⁷. Es ist jedoch zu bedenken, dass jeweils nur kleine Defekte gefüllt werden, jedoch nicht sog. critical size Defekte, bei denen man davon ausgeht, dass es bei einem natürlichen Heilungsverlauf nicht zur vollständigen Durchbauung mit Knochen

kommt^{67,75}. Für Aussagen über die mechanische Stabilität eines Produktes ist das Bohrlochmodell daher nicht geeignet⁷⁷. Hat sich eine Substanz im Bohrlochmodell als biokompatibel herausgestellt, so sind weiterführende Untersuchungen zur Bestimmung der mechanischen Stabilität und der Befähigung, critical size Defekte zu überbrücken, erforderlich. Es hat sich gezeigt, dass das Bohrlochmodell für Versuche an Röhrenknochen gut geeignet ist^{21,23,49,77,90}. Schädelknochen hingegen weisen Unterschiede in ihrer anatomischen und histologischen Struktur auf: sie bestehen überwiegend aus Spongiosa mit einer nur dünnen Cortikalis, eine einheitliche Markhöhle fehlt¹²³. Während Röhrenknochen aus knorpeligen Vorstufen entstehen (enchondrale Ossifikation), werden die Schädelknochen durch desmale Ossifikation direkt im Bindegewebe gebildet¹²³.

Diverse Studien zeigen, dass der Beobachtungszeitraum von sechs bis acht Wochen gut geeignet ist, Resorptions- und Regenerationsvorgänge am Knochen zu beurteilen. Nach diesem Zeitraum ist das durch die Operation entstandene Hämatom abgebaut, die Resorption des Fremdmaterials und der Knochenzuwachs haben bereits sichtbar eingesetzt und auch die Biokompatibilität entscheidet sich in den ersten Wochen post operationem, denn zu einem späteren Zeitpunkt konnte keine neu aufgetretene Zunahme an störendem Bindegewebe im Sinne einer Kapselbildung beobachtet werden^{20,21,22,23,24,124}. In der vorliegenden Studie wurden die unterschiedlichen Resorptionsprozesse und –zeiträume deutlich, denn einige Materialien (z. T. Hydrogele, Kalziumsulfat) waren bereits vollständig resorbiert, während andere (z. Bsp. Hydroxyapatit) noch nahezu vollständig vorhanden waren.

5.1.3 Operationsdurchführung

Die Operationen verliefen bei allen Tieren ohne schwerwiegende Komplikationen.

Durch die standardisierten Zugänge an Humerus und Femur bzw. Tibia wurden möglichst gleiche Bedingungen für das Anfertigen der Bohrlöcher und das anschließende Befüllen mit dem entsprechenden Biomaterial geschaffen.

Bei diesem Operationsmodell wurde durch das weitgehend atraumatische Vorgehen die größtmögliche Schonung der Weichteile und des Periosts gewährleistet. Die Bedeutung des Periosts für die Knochenheilung wird von vielen Autoren hervorgehoben^{95,125}.

Um die Gefahr einer Embolie durch Bohrmehl oder Fett zu reduzieren¹²⁵, wurde das Anbohren der Markhöhle vermieden.

Zusätzlich ist zu beachten, dass die Bohrlöcher am proximalen Humerus und Femur in die Metaphyse, bzw. am distalen Humerus und Femur in die Diaphyse gesetzt werden sollten⁷⁷,

da sonst wegen der Makro- und Mikrostruktur des Knochens bei mechanischer Belastung Spontanfrakturen auftreten können.

Die postoperative Versorgung der Tiere mit Medikamenten, insbesondere der Einsatz nicht-steroidaler Antiphlogistika, kann die Knochenheilung beeinflussen⁷⁶. Die kurzzeitige Anwendung erschien aus Tierschutzgründen gerechtfertigt.

5.2 Eingesetzte Knochenersatzmaterialien

5.2.1 Hydrogele

Es wurden in dieser Studie 18 verschiedene Hydrogelpräparate im Hinblick auf ihre Eignung als Knochenersatzmaterial getestet. Die Handhabung während der Operation erwies sich dabei in einigen Fällen als schwierig, da es zu einem Ausfließen des Materials aus dem Bohrloch kam. Eine Optimierung von Konsistenz und Viskosität erscheint wünschenswert. Hydrogele gelten als biokompatibel und werden einerseits extrazellulär durch Hydrolyse, andererseits intrazellulär in Makrophagen und Riesenzellen abgebaut²⁵. Die ermittelten Zellverteilungen spiegeln somit erwartungsgemäß die Verteilung der Phagozyten wieder, die für die Resorption des Fremdmaterials Hydrogel zuständig sind.

Auch spielen weitere Enzyme und die mechanische Belastung³⁹ eine Rolle, die aufgrund des gewählten Modells hier allerdings nicht untersucht werden konnte. Die Bildung von Riesenzellen ist offensichtlich von der Zusammensetzung des Hydrogels abhängig und wird dabei von der Trägersubstanz (Polyethylenglykol häufiger als Fibrin) und evtl. eingesetzten Zusätzen mit bestimmt. Dies wurde auch in einer *in vitro*-Studie von Smetana et al. nachgewiesen⁸⁷. Vinatier et al. beobachteten Entzündungsreaktionen durch Abbauprodukte aus Polymeren³⁴, während Bergsma et al. eine Fremdkörperreaktion ohne Entzündungsanzeichen beschrieben⁹⁷. In dieser Studie zeigte sich, dass es in einigen Fällen zwar zur Bildung von mehrkernigen Riesenzellen kam, jedoch selten zur Vermehrung von Lymphozyten und Plasmazellen (Abb.17, Grafik 1 und 2). In diesen Fällen kann wohl nicht von einer chronischen Entzündungs- oder Fremdkörperreaktion gesprochen werden. Auch Hollinger sieht im Fehlen von Lymphozyten- und Plasmazellansammlungen eine fehlende Immunogenität der Fremdschubstanz⁴².

Hydrogel Nr. 8 wies mit 5,83 % mehrkerniger Riesenzellen die höchsten gefundenen Werte im Zentrum auf, jedoch waren hier in den weiteren Zonen nur wenige (< 0,5 %) mehrkernige

Riesenzellen nachgewiesen worden., so dass nicht von einer Fremdkörperreaktion mit persistierenden Riesenzellen auszugehen war, sondern es als Hinweis darauf gewertet wurde, dass im Rahmen der Biodegradation dieses Materials mehrkernige Riesenzellen zu erwarten waren.

In Kombination mit hohen Werten für Lymphozyten, Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen sprach dies für eine erschwerte Phagozytierbarkeit des Materials H 12 und für eine geringere Biokompatibilität.

Der Korrelationstest nach Spearman zeigte, dass Lymphozyten und Plasmazellen in den Zonen 1, 2 und 4 bei einem Signifikanzniveau von 0,01 positiv miteinander korreliert waren. Dies kann durch die gegenseitige Beeinflussung durch Zytokine im Rahmen der Modulation der Immunreaktion erklärt werden (vgl. 2.5.1)^{79,98}.

Hingegen konnten nur in Einzelfällen signifikante Korrelationen zwischen Lymphozyten und Plasmazellen einerseits und Riesenzellen bzw. Makrophagen andererseits gefunden werden. Dies spricht dafür, dass vermehrtes Auftreten von Phagozyten nicht unmittelbar zur Erhöhung der inflammatorischen Zellen (Lymphozyten, Plasmazellen) führte und somit nicht als schädigend für den Heilungsverlauf gewertet werden konnte.

5.2.2 Kalziumphosphat-Verbindungen

Kalziumphosphat-Verbindungen werden seit Jahrzehnten alleine oder in Kombination mit Metallimplantaten mit guten Ergebnissen als Knochenersatzmaterial eingesetzt. Die Applikation von Zementen in Form von injizierbaren Pasten hat sich dabei einerseits wegen der einfachen Handhabbarkeit bewährt^{20,21,126} andererseits gewährleistete diese Darreichungsform einen engen Kontakt zum umgebenden Knochen. Beides konnte in den eigenen Studien bestätigt werden.

Die ermittelten Werte zeigten eine erwartete Zellverteilung, in der die Makrophagen dominieren, da die Resorption bei Brushite-Zementen durch Dissolution und überwiegend Makrophagen zentripetal erfolgte^{49,53,76}, während es bei den nicht, bzw. nur sehr langsam resorbierbaren Hydroxyapatit-Zementen zu einer rein zellulären Degradation durch Osteoklasten kam^{2,20,21}. Der Zeitpunkt der Untersuchung in der vorliegenden Studie war mit 8 Wochen post operationem für die Beurteilung der Apatit-Zemente nicht optimal: es kam hier zu einer starken Artefaktbildung, weil noch keine Durchbauung stattgefunden hatte (Abb. 18) und die feste Zementmasse beim Anfertigen der Dünnschnitte herausgelöst wurde. Diese Präparate konnten aber trotzdem zur Beurteilung der Biokompatibilität herangezogen werden,

da mehrere Zonen untersucht wurden. Die Anzahl der Makrophagen überstieg die in den Leerkontrollen um das bis zu 12,5fache (vgl. Grafik 6).

Die in der Literatur hervorgehobene gute Biokompatibilität der Zemente und β -TCP-Keramik^{2,13,54,124} konnte in dieser Studie bestätigt werden, da keine Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen als Zeichen einer chronischen Immunreaktion nachgewiesen wurden. Ebenso wurde keine Zunahme von Bindegewebe als Zeichen einer mangelhaften knöchernen Durchbauung gefunden. Im klinischen Einsatz sind die divergierenden Resorptionsgeschwindigkeiten zu beachten und die Materialien in Bezug auf die entsprechende Indikationsstellung zu wählen.

Bei der Auswertung des statistischen Tests nach Spearman fielen positive Korrelationen zwischen Lymphozyten und Plasmazellen in allen 4 Zonen auf einem hohen Signifikanzniveau von 0,01 (zweiseitig) auf. Dies deckte sich mit der Beobachtung bei den Hydrogelen (siehe 5.2.1). Zusätzlich wurde eine positive Korrelation mit einer Signifikanz auf dem 0,01 Niveau (zweiseitig) zwischen Lymphozyten und Makrophagen in den Zonen 2, 3 und 4 beobachtet. Auch hier war eine gegenseitige Beeinflussung über Chemokine zu vermuten. Ähnlich wie bei den Hydrogelen zeigten sich im Bereich des Bohrlochs keine signifikanten Korrelationen zwischen dem Auftreten von Lymphozyten und Riesenzellen.

5.2.3 Seide

Die histologische Auswertung zeigte, dass der Abbau der Seiden überwiegend durch Makrophagen und Riesenzellen erfolgte. Es zeigte sich, dass die starken Ansammlungen der mehrkernigen Riesenzellen auf das Bohrloch beschränkt blieben und nicht vermehrt außerhalb des Defekts nachgewiesen werden konnten.

Der Abbau der Seide durch mehrkernige Riesenzellen ist als physiologisch anzusehen, da die Fasern für die Phagozytose durch Makrophagen zu groß sind⁷⁴. Ebenso wird die Knochenneubildung durch die unmittelbare Nachbarschaft der mehrkernigen Riesenzellen nicht gestört, was hier wiederholt beobachtet werden konnte (Abb. 19). Eine gute Biokompatibilität wird von Übersax et al.⁶⁴, Fini et al.⁶⁸ und Apfel¹²⁷ bestätigt, allerdings konnten in der vorliegenden Studie häufig Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen nachgewiesen werden (Abb. 20). Dabei schien das Herstellungsverfahren mit Salz häufigere und stärkere Reaktionen auszulösen: in 5 von 12 Fällen kam es bei Matrices mit Poren auf Paraffin-Basis zur Bildung eines Bindegewebsaumes, bei denjenigen Matrices mit Poren auf Basis von Salz sogar in 10 von 12 Fällen. Beim Einsatz der Seidenmatrix S4

wurden die höchsten gezählten Lymphozytenwerte (im Durchschnitt 43,75 Lymphozyten pro Gesichtsfeld in Zone 2 im Vergleich zu durchschnittlich 0,5 Lymphozyten in den Leerproben) gefunden und auch die Plasmazellen traten vermehrt auf. Die Bildung des Bindegewebssaumes fand überwiegend in Zone 2 statt, im peripheren Bereich des Bohrloches (Zone 3) hatte dabei schon eine zentripetale Resorption der Seidenmatrices erfolgreich stattgefunden.

Da die mehrkernigen Riesenzellen offensichtlich in der Lage waren, die Seidenmatrices innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 8 Wochen teilweise erheblich abzubauen, bleibt unklar, was die starke Immunreaktion ausgelöst hat. Der höchste Wert für mehrkernige Riesenzellen (durchschnittlich 32,5 %) wurde bei S2 gefunden, das als Lösungsmittel für die Matrices verwendete Hexan könnte hierbei eine Rolle gespielt haben.

Da Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen als Zeichen eines persistierenden Entzündungsreizes zu sehen sind¹¹⁴, muss bei den Seidenpräparaten S1, S3 und S4 von einer reduzierten Biokompatibilität ausgegangen werden, so dass die Zusammensetzungen bzw. Herstellungsprozesse weiter optimiert werden sollten.

Die Analyse des Spearman Tests für die Zellverteilung bei den Seidenpräparaten zeigte nur in Zone 3 positive Korrelationen auf dem Signifikanzniveau von 0,01 (zweiseitig) für Lymphozyten und Plasma- bzw. Riesenzellen und Riesenzellen und Makrophagen. Dagegen liegen keine signifikanten Korrelationen zwischen Riesenzellen und Lymphozyten in Zone 1 und 2 vor. Das vermehrte Auftreten von Lymphozyten und Plasmazellen v. a. in Zone 2 spricht für einen persistierenden entzündlichen Reiz, von dem entsprechend der Korrelationsanalyse nicht auf eine erhöhte Anzahl von Riesenzellen rückgeschlossen werden konnte. Somit lässt sich im Umkehrschluss sagen, dass das vermehrte Auftreten von Riesenzellen nicht zwingend mit einem Anstieg an Entzündungszellen einhergeht und nicht als Zeichen einer verringerten Biokompatibilität zu werten ist.

5.2.4 Leerkontrollen

Die Leerkontrollen zeigten sich erwartet zellarm in Bezug auf die erfassten Zelltypen, da überwiegend Bindegewebe mit neu gebildetem Knochen vorlag. 8 Wochen post operationem ist das im Frakturspalt entstandene Hämatom abgebaut und der Defekt mit Bindegewebe aufgefüllt worden. Mehrkernige Riesenzellen sind hier überwiegend den Osteoklasten zuzuordnen, die sich an der neu gebildeten und bereits im Umbau befindlichen Knochensubstanz angelagert haben.

5.3 Probengewinnung, -aufbereitung und -auswertung

Vereinzelt kam es zu fehlerhafter Schnittführung bei der Probengewinnung, da das Bohrloch als solches bereits nach acht Wochen nicht mehr sicher zu erkennen war. Die radiologische Untersuchung konnte zwar in allen Fällen den Bohrlochdefekt nachweisen, die fehlerhafte Schnittführung jedoch nicht immer verhindern, so dass in Einzelfällen die Schnittebene nicht die gewünschten 90 ° zum Bohrlochdefekt aufwies. War eine Zuordnung zu den vier Zonen des Bohrloches möglich, wurden die Schnitte histologisch ausgewertet. In 14 Fällen gelang die Zuordnung zu den Zonen nicht, diese Schnitte wurden nicht in die histologische Untersuchung mit einbezogen.

Beim Anfertigen der Dünnschnitte kam es bei den langsam resorbierbaren Hydroxyapatit-Zementen zu einem Herauslösen der Zementreste im Bohrkanal. Diese Artefaktbildung ist durch die mangelnde Umbauung des Fremdmaterials mit Knochen bzw. Bindegewebe zu erklären.

Als Färbung für die Dünnschnitte wurden Toluidinblau und von Kossa / Mac Neal gewählt. Toluidinblau hat sich in der Beurteilung von Zement, Resorptionszone, Osteoid, Knochensubstanz und mehrkernigen Riesenzellen bewährt^{20,21,22,23,128,129,130}, da es selektiv an die basophilen Proteoglykane bindet¹³¹. Ebenso eignet sich diese Färbung zur Beurteilung des Remodelings, da sich die Zementlinien gut darstellen lassen und nur eine geringe Artefaktbildung auftritt¹³². Zur Beurteilung der Kalzifizierung ist die von Kossa entwickelte Versilberung durch die starke Kontrastbildung besonders geeignet. Die Gegenfärbung mit Mac Neal's Tetrachrom erlaubt die Beurteilung der Zellkerne, des Zytoplasmas und des Osteoids.

Eine immunhistochemische Färbung zur Identifizierung der Osteoklasten anhand des Enzyms Tartrate-resistend Acid Phosphatase (TRAP) wurde nicht vorgenommen, die Zuordnung der Zement resorbierenden Zellen zu den Osteoklasten bzw. mehrkernigen Riesenzellen ist in der Literatur weiterhin umstritten (siehe 5.4.1).

Für die Korrelationsanalysen wurden die Materialien der Hydrogele, Kalziumphosphat-Verbindungen und Seiden trotz ihrer teilweise sehr unterschiedlichen Zusammensetzung in ihren Gruppen zusammengefasst. Eine Analyse der einzelnen Zubereitungen (H1, H2, H3 etc.) und deren Korrelationen wäre statistisch nicht zulässig gewesen, da hierfür zu wenige Proben vorlagen. Dies führt zu einer starken Vereinfachung der Resultate, die nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die Verträglichkeit der einzelnen Materialien zulässt. Allerdings lag der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit in der Herausarbeitung eines

allgemeinen Trends hinsichtlich der Zellverteilung bei den Materialgruppen. Dabei wurden erstmalig die Zellverteilung in den vier verschiedenen Zonen des Bohrloches, sowie die einzelnen Zellen quantitativ erfasst.

5.4 Histologische Beurteilung der Präparate

Zur histologischen Beurteilung wurden die mittels Toluidinblau gefärbten Dünnschnitte herangezogen. Diese ermöglichten eine gute Darstellung der Knochensubstanz, der eingebrachten Biomaterialien - soweit noch vorhanden - und der Zellen. Für die Darstellung der Makrophagen erwies sich diese Färbung je nach implantiertem Biomaterial als ungünstig, da vor allem bei Hydrogel-Präparaten die phagozytierten Partikel zu einer optischen Aufhellung des Zytoplasmas führten und die Zellkerne daher nur schwer abzugrenzen waren. In diesen Fällen wurde die von Kossa-Versilberung mit Mac Neal'sche Tetrachrom-Gegenfärbung zur Abgrenzung der Makrophagen hinzugezogen.

5.4.1 Identifizierung der Zellen

Die Zellen wurden semiquantitativ erfasst und anhand der oben beschriebenen (3.5.1) morphologischen Kriterien den verschiedenen Zelltypen zugeordnet. Die Schwierigkeit bestand dabei in der Unterscheidung zwischen Osteoklasten und mehrkernigen Riesenzellen. Immer wieder werden bei histologischen Auswertungen „Osteoklasten-ähnliche Zellen“ beschrieben^{2,20,91,104,109}, die Kalziumphosphat-Verbindungen resorbieren, aber phänotypisch wie Osteoklasten aussehen. Nach Athanasou et al.¹⁰³ ist die Identifizierung der Osteoklasten an ihren Calcitonin-Rezeptoren und an der Lage der Zellen in Knochenlakunen möglich und anerkannt, aber auch an Materialien mit einem Kalzium-Phosphat-Verhältnis und einer Kristallgröße ähnlich dem normalen Knochen, wie beispielsweise Biobon®, können Osteoklasten angetroffen werden²¹. Einige Autoren bezweifeln, dass Osteoklasten auch Fremdmaterial abbauen können¹³³, allerdings gelingt es in Zellkulturen aus Osteoklasten, phagozytierte Titan- und Latex-Partikel nachzuweisen¹⁰².

Eine eindeutige Zuordnung erscheint mittels Toluidinblau gefärbter Dünnschnittpräparate nicht möglich. Deshalb wurden alle Zellen, die in den Zonen 1-3 am Fremdmaterial oder im umgebenden Bindegewebe auftraten und mehrere Nuclei enthielten zu den mehrkernigen Riesenzellen gezählt. Diejenigen mehrkernigen Zellen, die sich in Zone 3 oder 4, befanden

und die in Lakunen am „reifen“ Knochen saßen (Abb. 20) wurden als Osteoklasten bezeichnet.

5.4.2 Beurteilung der Immunreaktion auf die Implantation von Knochenersatzmaterialien

Jeder lebende Organismus reagiert auf einen schädigenden Reiz mit einer komplexen Abwehrreaktion, die zum Ziel hat, die Noxe zu vermindern oder zu beseitigen und im Sinne der Heilung die Ausgangssituation wieder herzustellen⁴². Für diesen Prozess wird allgemein der Begriff „Entzündung“ oder „Immunreaktion“ verwendet. Bergsma et al. sprechen von einer Fremdkörperreaktion ohne Entzündungsanzeichen⁹⁷, Tang und Eaton von „natürlichen Antworten auf unnatürliche Materialien“¹⁰⁸. Allein durch den operativen Reiz kommt es im betroffenen Gebiet zu einer Vielzahl von zellulären und biochemischen Reaktionen, so dass auch jedes Implantat eine Immunreaktion verursacht¹¹⁹. Entscheidend ist, dass es dabei nicht zu einer chronisch entarteten Entzündungsreaktion im Sinne einer Fremdkörperreaktion mit der Bildung eines Granuloms kommt, denn hier ist die Abstoßung des Implantates zu befürchten^{5,42,80}.

Zur Abgrenzung von physiologischer Immunreaktion und gestörtem Heilungsverlauf dienen zum einen der Zeitpunkt und zum anderen das Zellvorkommen der histologischen Evaluation. In der vorliegenden Arbeit wurde der Zeitraum von 6 bzw. 8 Wochen post operationem gewählt, da zu diesem Zeitpunkt die akute, unspezifische Immunreaktion, die in etwa 14 Tage dauert¹⁶, abgeschlossen ist. Zudem sind die Resorptionsvorgänge nach 8 Wochen auf ihrem Höhepunkt angelangt¹²⁴, so dass sich dieser Zeitraum als günstig für die Beurteilung der Gewebeverträglichkeit und der knöchernen Durchbauung erwiesen hat^{21,23,124}.

5.4.2.1 Beurteilung der Makrophagen

Makrophagen entstehen aus Blutmonozyten und sind die wichtigsten Phagozyten bei der Resorption von Fremdmaterialien, v. a. von Hydrogelen und Brushite-Zementen. Ihre Lebensdauer im Gewebe beträgt Tage bis Wochen¹¹⁰. Durch ihre enzymatische Ausstattung sind sie in der Lage, aufgenommene Partikel intrazellulär zu spalten. Über Antigenpräsentation (Major Histokompatibilitätsantigene (MHC-) II) und Cytokinfreisetzung aktivieren sie ihrerseits T-Lymphozyten⁷⁹. Sie werden von Goodman auch als Initiatoren und

Aktivatoren der Fremdkörperreaktion bezeichnet⁹⁸. Coleman et al. sehen Makrophagen ebenfalls als Schlüsselzellen für die chronische Entzündung im Sinne einer Fremdkörperreaktion¹¹³. Bei der Komposition eines Knochenersatzmaterials wird der Notwendigkeit Rechnung getragen, dass dessen Resorption nur so schnell gehen sollte, wie der Körper imstande ist, neuen Knochen zu bilden, um eine ausreichende Stabilisierung des Defektes zu erreichen. Dieser Umstand führt zu einem mehrere Wochen dauernden Abbauvorgang und damit immer zu einem „chronischen Entzündungsprozess“¹¹³. Einige Autoren bewerten Makrophagen in der Implantatumgebung als Schlüsselzellen für Osteolyse und Implantatlockerung^{98,106}, da diese auch die Aktivität der Osteoklasten beeinflussen und den lokalen pH- Wert senken, was zur Entmineralisierung der Knochenmatrix führt¹⁰⁶.

Die Bewertung der Makrophagen ist dabei im Zusammenhang mit dem eingesetzten Material zu sehen: bei metallenen und anderen nicht resorbierbaren Implantaten ist das Vorhandensein vieler Makrophagen kritisch zu bewerten, da diese durch die Phagozytose von Implantatdetritus eine Kaskade von weiteren Immunreaktionen und Osteolyse hervorrufen können⁹⁸. Das Freiwerden kleiner Partikel aus v. a. Metallimplantaten mit resultierender Implantatlockerung bzw. –abstoßung wird auch als „small particle disease“ bezeichnet⁹⁹. Auch Sabokbar et al. beobachteten Makrophagen, die Implantatpartikel enthielten und zu periprotetischer Knochenresorption führten und konnten bei *in vitro*-Versuchen nachweisen, dass Makrophagen in Gegenwart von u. a. Vitamin D3 zu TRAP-positiven, osteolytisch aktiven Zellen konvertierten⁸². Dagegen scheint das Vorkommen von Makrophagen bei resorbierbaren Implantaten unproblematisch, ja sogar normal und für den Abbau des Materials unabdingbar zu sein und die unmittelbare Nachbarschaft zu neu gebildetem Knochen zeigt, dass diese nicht mit dem Durchbauprozess interferieren (Abb. 22).

Die in dieser Studie untersuchten resorbierbaren Knochenersatzmaterialien der Klassen Kalziumphosphat-Verbindungen, Hydrogele und Seiden zeigen im Vergleich zur Leerkontrolle 10- bis 20-fache Makrophagenwerte im Bereich des Bohrkanals als erwartungsgemäßen Heilungsverlauf nach 6 bzw. 8 Wochen (Vgl. Grafik 6).

5.4.2.2 Beurteilung der mehrkernigen Riesenzellen

Mehrkernige Riesenzellen, die auch als Fremdkörperzellen oder Fremdkörper-Makrophagen⁸² bezeichnet werden, entstehen aus fusionierenden aktivierten Makrophagen unter der Einwirkung verschiedener Cytokine (IL4, IL13) und unter Vermittlung spezieller Membranrezeptoren (Mannose-Rezeptoren⁸⁰). Dabei scheint die Anwesenheit von

Lymphozyten die Fusion zu fördern⁸⁰, bzw. Voraussetzung zu sein⁷⁹. Die funktionellen Komponenten (u. a. Membranrezeptoren) von Makrophagen und Riesenzellen sind dabei dieselben und beide nehmen an der Abwehrreaktion teil¹⁰⁷. Dabei können die Riesenzellen das 20-bis 30fache an Sauerstoffradikalen produzieren wie einzelne Makrophagen¹⁰⁷.

Die Beurteilung, ob Riesenzellen schädlich sind oder nicht, wird in der Literatur sehr widersprüchlich diskutiert. Insbesondere im Zusammenhang mit gelockerten Implantaten sehen viele Autoren mehrkernige Riesenzellen als auslösendes Moment an^{20,84,86,98,133}. Dabei ist zu bedenken, dass viele Autoren in diesem Zusammenhang von der Bildung eines Granuloms, bzw. einer dichten Schicht an bindegewebigem Granulationsgewebe ausgehen. Dabei versucht der Körper, den nicht zu beseitigenden Fremdkörper zu isolieren⁴², ähnlich wie auch bei der Immunreaktion gegen Parasitenlarven, Pilze (Aspergillose) oder bestimmte Bakterien (Mycobakterien bei Tuberkulose). Es ist verständlich, in diesem Zusammenhang die mehrkernigen Riesenzellen als schädlich für den Heilungsprozess zu betrachten, jedoch zeigen zahlreiche andere Studien, dass das alleinige Vorkommen mehrkerniger Riesenzellen keine schädigende Wirkung auf den Reparationsprozess besitzt^{40,90,105,114}. Frayssinet et al. konnten keine Störung des Knochenwachstums in Gegenwart mehrkerniger Riesenzellen beobachten⁹⁰. Auch andere Autoren sehen in Riesenzellen geeignete Phagozyten für den Abbau langsam resorbierbarer Biomaterialien^{40,105}. Dies stimmt mit unserer Beobachtung überein, dass die Riesenzellen überwiegend in Zone 1 und 2 nachgewiesen wurden, demnach die äußeren Bereiche des Knochenersatzmaterials bereits erfolgreich phagozytiert worden waren und dort mehrkernige Riesenzellen infolgedessen nicht mehr nachweisbar waren. Die Biokompatibilität dieser Materialien scheint gut zu sein, wenn nur wenig weitere Entzündungszellen vor Ort sind^{25,42,97}. In der vorliegenden Arbeit konnte kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten mehrkerniger Riesenzellen und mangelnder Resorption bzw. ausbleibendem Knochenwachstum gesehen werden. Auch in unmittelbarer Nachbarschaft von zahlreichen Riesenzellen kam es zur Neubildung von Knochen mit Ablagerung von Osteoid (Abb. 23). Die Rate der Knochenneubildung wurde in der vorliegenden Untersuchung nicht gemessen, jedoch wurden nur solche Substanzen eingesetzt, die in früheren Studien zu einer für den beobachteten Zeitraum erwarteten Knochenneubildung geführt hatten^{20,21,22,23,24}.

Vielmehr scheint das Auftreten der Riesenzellen materialabhängig zu sein und wurde am stärksten bei den Seidenpräparaten, aber auch bei einigen Hydrogelen und Zementen gesehen. Das gehäufte Auftreten von Kapselbildung bei den Seidenpräparaten weist jedoch auf eine reduzierte Biokompatibilität hin, so dass das Vorkommen von über 15 % mehrkernigen

Riesenzellen pro Gesichtsfeld im Bereich des Bohrkanals kritisch zu bewerten ist. Treten Riesenzellen in Kombination mit Clustern von Lymphozyten und Plasmazellen auf, so ist eine schädigende Wirkung der Riesenzellen nicht auszuschließen.

5.4.2.3 Beurteilung der Lymphozyten und Plasmazellen

Lymphozyten und Plasmazellen besitzen eine Schlüsselfunktion für die humorale Abwehr in der Unterscheidung zwischen körpereigen und -fremd und können eine verzögerte Hypersensitivitätsreaktion auslösen^{98,110}. Da sie am Resorptionsprozess nicht teilnehmen, liegen ihre Aufgaben in der Modulation der Immunreaktion^{79,98}. Die Lymphozyten werden dabei durch Cytokine (IL 2, 6) aus den Makrophagen angelockt und produzieren ihrerseits eine Reihe von Cytokinen, wie IL- 4 und IL-13, was wiederum die Bildung von mehrkernigen Riesenzellen fördert⁷⁹. Nach Shen et al.¹¹⁶ ist das Vorhandensein von IL- 4 Bedingung für die Entstehung von Riesenzellen. Besonderes Augenmerk lag daher auf dem Vorkommen von Lymphozyten und Plasmazellen in Clustern, unmittelbar in der Nähe des eingebrachten Fremdmaterials (Abb. 24). Es zeigte sich, dass in den Fällen vermehrten Auftretens von Lymphozyten und Plasmazellen tatsächlich zahlreiche mehrkernige Riesenzellen zu finden waren, und zwar materialabhängig bei den Seiden- und einzelnen Hydrogel-Präparaten (H8, H12, S1-4). Eine signifikante Korrelation zwischen mehrkernigen Riesenzellen und Lymphozyten bzw. Plasmazellen konnte allerdings nicht nachgewiesen werden, da hierfür die Materialgruppen zusammengefasst wurden (Vgl. Tabelle 8 und 10). Diese lokalen Ansammlungen waren nur in wenigen Präparaten nachweisbar, so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Biokompatibilität dieser Materialien unzureichend ist. Trotzdem war auch in diesen Präparaten die Resorption des Materials und die Bildung neuen Knochens erkennbar. Kam es dagegen zu einer ringförmigen Ansammlung von zahlreichen Lymphozyten und Plasmazellen in zirkulär geordnetem Bindegewebe um das gesamte Fremdmaterial, so versuchte der Körper offensichtlich durch Kapselbildung diesen Fremdkörper zu isolieren und eine Heilung im Sinn knöcherner Durchbauung wurde verzögert oder ganz verhindert (H1, H5, H8, S1-4). Das vereinzelte Vorkommen von Lymphozyten und Plasmazellen bzw. von mehrkernigen Riesenzellen ohne Ansammlungen von Lymphozyten und Plasmazellen in der Nachbarschaft (Abb. 17) schien keine negativen Auswirkungen auf den Resorptions- und Reparatursprozess zu haben.

6 Schlussfolgerung

Wie in der vorliegenden Studie gezeigt werden konnte, liefert die histologische Untersuchung 6 bis 8 Wochen nach Implantation eines resorbierbaren Knochenersatzmaterials im Bohrlochmodell zuverlässige Hinweise auf die Biokompatibilität *in vivo*. Die zelluläre Reaktion auf das eingebrachte Fremdmaterial zeigt materialabhängige Gemeinsamkeiten und Unterschiede.

Grundsätzlich nimmt die Anzahl der Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen und mehrkernigen Riesenzellen vom Zentrum des Bohrlochs zur Peripherie hin ab. Grund hierfür ist die zentripetale Resorption des implantierten Materials, so dass zum Zeitpunkt der Untersuchung in der Peripherie die resorbierenden Zellen bereits nicht mehr vorhanden waren. Die Art des eingebrachten Materials hat Auswirkungen auf die zu erwartenden Zellpopulationen, bei kleinmolekularen Materialien sind Makrophagen zu erwarten, bei großmolekularen Materialien wie Hydrogelen und Seiden Makrophagen und mehrkernige Riesenzellen. Das vermehrte Auftreten von Lymphozyten und Plasmazellen ist unabhängig hiervon ein Hinweis auf eine verringerte Verträglichkeit des Fremdmaterials, insbesondere wenn diese Zellen in einem Saum aus festem Bindegewebe und zirkulär um das Fremdmaterial angeordnet liegen.

Mehrkernige Riesenzellen scheinen keinen direkten negativen Einfluss auf die Bildung neuen Knochengewebes zu besitzen, da sie regelmäßig in dessen unmittelbarer Nachbarschaft nachgewiesen werden konnten. Die fehlende Korrelation von Lymphozyten bzw. Plasmazellen und mehrkernigen Riesenzellen lässt darauf schließen, dass das Vorkommen von Riesenzellen nicht allein als Hinweis auf einen persistierenden Entzündungsreiz zu sehen ist.

Die vorliegende Untersuchung ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass die vorhanden Riesenzellen bei allen eingesetzten Materialien das Zeichen eines normalen Abbaus sind und nicht als Unverträglichkeit zu werten sind.

7 Ausblick

Knochenersatzmaterialien spielen im klinischen Alltag eine wichtige Rolle. Auf der Suche nach dem optimalen Material werden immer wieder neue Substanzen getestet und bewährte Zusammensetzungen durch den Zusatz von Kontrastmitteln, Antibiotika oder Mediatoren ergänzt. Dabei muss die Frage der Biokompatibilität immer wieder neu beantwortet werden. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie liefern einen Hinweis auf die zu erwartenden Zellpopulationen 6 - 8 Wochen post operationem. Weiterer Forschungsbedarf besteht in der Frage, was genau am Material die Bildung von mehrkernigen Riesenzellen auslöst und ob das Vorkommen der mehrkernigen Riesenzellen die Knochenneubildung quantitativ einschränkt. Die Zusammensetzung bzw. Herstellungsverfahren der Seidenmatrices sollten weiter optimiert werden, um die Vorteile der Seiden auch im klinischen Einsatz nutzen zu können. In nachfolgenden Studien kann in Kombination mit der Messung des Knochenzuwachses und der verbliebenen Menge Fremdmaterial so die Auswahl geeigneter Knochenersatzmaterialien für den klinischen Einsatz erleichtert werden. Diejenigen Knochenersatzmaterialien, die sich im Bohrlochmodell bewährt haben, sind anschließend in weiteren Studien auf ihre Belastbarkeit und Langzeitverträglichkeit zu testen.

8 Literaturverzeichnis

1. Psychrembel W (Hrsg.): **Psychrembel Klinisches Wörterbuch**, 257. Auflage de
tyter Verlag, Berlin; New York, 1994:713,1557.
2. Eggli P, Müller W, Schenk RK: **Porus Hydroxyapatite and Tricalcium Phosphate
Cylinders with Two Different Pore Size Ranges Implanted in the Cancellous Bone
of Rabbits.** *Clin Orthop Relat Res* 1988 (232):127-138.
3. Middleton JC, Tipton AJ: **Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices.**
Biomaterials 2000, **21(23)**:2335-2346.
4. Jones LC und Hungerford, DS: **Cement Disease.** *Clin Orthop Relat Res* 1987,
225:192-206.
5. Boss JH, Shajrawi I, Aunullah J, Mendes DG: **The Relativity of Biocompatibility.** *Isr
J Med Sci* 1995, **31**:203-209.
6. Phemister DB: **Repair of Bone in the Presence of Aseptic Necrosis Resulting from
Fractures, Transplantations, and Vascular Obstruction.** *J Bone Surg Am* 2005,
87(3):672.
7. Mc Kibbin B: **The Biology of Fracture Healing in Long Bones.** *J Bone Joint Surg*
1978, **60B(2)**:150-162.
8. Ekholm EC, Hietaniemi K, Määttä A, Vuorio E, Paavolainen P, Penttinen RPK:
Extended Expression of Cartilage Components in Experimental Pseudarthrosis.
Conn Tiss Res 1995, **31(3)**:211-218.
9. Schmitz JP, Hollinger JO, Milam SB: **Reconstruction of bone using calcium
phosphate bone cements: a critical review.** *J Oral Maxillofac Surg* 1999, **57**:1122-
1126.
10. Gazdag AR, Lane JM, Glaser D, Forster RA: **Alternatives to Autogenous Bone
Graft: Efficacy and Indications.** *J Am Acad Orthop Surg* 1995, **3**:1-8.
11. Gerngross H, Burri N, Kinzl L, Merk J, Müller GW: **Komplikationen an den
Entnahmestellen autologer Spongiosatransplantate.** *Akt Traumatol* 1982, (12):146-
152.
12. Friedlaender GE: **Bone-Banking.** *J Bone Joint Surg Am* 1982, **64**:307-311.
13. Damien CJ, Parsons JR: **Bone Graft and Bone Graft Substitutes: A Review of
Current Technology and Applications.** *J Appl Biomat* 1991, **2**:187-208.
14. Burchardt H: **The Biology of Bone Graft Repair.** *Clin Orthop Relat Res* 1983,
174:28-42.
15. Bauer TW, Muschler GF: **Bone Graft Materials.** *Clin Orthop Relat Res* 2000,
371:10-27.
16. Garg M, Dev G, Misra K, Tuli SM: **Early Biologic Behavior of Bone Grafts.** *Acta
Cytol* 1997, **41**:765-770.
17. Younger EM und Chapman MW: **Morbidity at Bone Graft Donor Sites.** *J Orthop
Trauma* 1989, **3(3)**:192-195.
18. Muschler GF, Lane JM: **Orthopedic Surgery.** In: *Bone Grafts and Bone Substitutes*,
Habal MB Reddi AH (Hrsg.), WB Saunders, Philadelphia: 1992:375-407.
19. Urist MR, Silverman BF, Büring K, Dubuc FL, Rosenberg JM: **The Bone Induction
Principle.** *Clin Orthop* 1976, **53**:243-283.
20. Apelt D, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinsky K, Brettschart-Wolfsberger R, Böhner M,
Matter S, Auer JA, von Rechenberg B: **In vivo behavior of three different injectable
hydraulic calcium phosphate cements.** *Biomaterials* 2004, **25**:1439-1451.
21. Oberle A, Theiss F, Böhner M, Müller J, Kästner SB, Frei C, Boecken I, Zlinsky K,
Wunderlin S, Auer JA, von Rechenberg B: **Untersuchungen über den klinischen
Einsatz von Brushite- und Hydroxylapatit-Zement beim Schaf.** *Schwei Arch
Terheilk* 2005, **147(11)**:482-490.

22. Von Doernberg C: **Evaluation of the biodegradation behaviour of β -TCP-cylinders with four different pore diameters.** Pferdekl. der Vetsuisse Fakultät Zürich, Universität Zürich 2005.
23. Kemper M: **Screeningversuch zur Optimierung synthetischer und fibriner Hydrogele als dreidimensionale Trägersubstanz für Bone Morphogenetic Protein, Transforming Growth Factor-beta und Parathormon zur Beschleunigung der Knochenheilung.** Pferdekl. der Vetsuisse Fakultät Zürich, Universität Zürich, 2003.
24. Génot OR: **Evaluation von vier biodegradierbaren injizierbaren Knochenzementen in einer experimentellen Studie an Schafen.** Pferdekl. der Vetsuisse Fakultät Zürich, Universität Zürich, 2006.
25. Cadée JA, van Luyn MJA, Brouwer LA, Plantinga JA, von Wachem PB, de Groot CJ, den Otter W, Hennink WE: **In vivo biocompatibility of dextran-based hydrogels.** *J Biomed Mater Res* 2000, **50**:397-404.
26. Trojani C, Weiss, Michiels JF, Vinatier C, Guicheux J, Daculsi G, Gaudray P, Carle F, Rochet N: **Three-dimensional culture and differentiation of human osteogenic cells in an injectable hydroxypropylmethylcellulose hydrogel.** *Biomaterials* 2005, **26**:5509-5517.
27. Weiss C, Jelkmann W: **Funktion des Blutes.** In: Schmidt, R.F., Thews, G. (Hrsg.), *Physiologie des Menschen*, 26. Auflage, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1995:427-434.
28. Silver FH, Wang MC, Pins GD: **Preparations and use of fibrine glue in surgery.** *Biomaterials* 1995, **16**(12):891-903.
29. Boyce ST, Holder IA, Supp AP, Warden GD, Greenhalgh DG: **Delivery and activity of antimicrobial drugs released from human fibrin sealant.** *J Burn Care Rehabil* 1994, **15**(3):251-255.
30. Pandit AS, Feldman DS, Caulfield J: **In vivo wound healing response to a modified degradable fibrin scaffold.** *J Biomater Appl* 1998, **12**(3):222-236.
31. Horowitz MS, Rooks C, Horowitz B, Hilgartner MW: **Virus safety of solvent/detergent- treated antithrombotic factor concentrate.** *Lancet* 1988, **2** (8604):186-189.
32. Burdick JA, Mason MN, Hinman AD, Thorne K, Anseth KS: **Delivery of osteoinductive growth factors from degradable PEG hydrogels influences osteoblast differentiation and mineralization.** *J Control Release* 2002, **83**(1):53-63.
33. Lutolf M P, Weber FE, Schmoekle HG, Schense JC, Kohler T, Müller R, Hubbell JA: **Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices.** *Nature Biotechnology* 2003, **21**:513-518.
34. Vinatier C, Guicheux J, Daculsi G, Layrolle P, Weiss P: **Cartilage and bone tissue engineering using hydrogels.** *Biomed Mater Eng* 2006, **16**(14):107-113.
35. Pratt AB, Weber FE, Schmoekle FE, Müller R, Hubbell JA: **Synthetic Extracellular Matrices for In Situ Tissue Engineering.** *Biotechnol Bioeng* 2004, **86**(1):27-36.
36. Yamamoto M, Takahashi Y, Tabata Y: **Enhanced Bone Regeneration at a Segmental Bone Defect by Controlled Release of Bone Morphogenetic Protein-2 from a Biodegradable Hydrogel.** *Tissue Eng*, 2006, **12** (5):1305-1311.
37. Sanginario V, Ginebra MP, Tanner KE, Planell JA, Abrosio L: **Biodegradable and semi-biodegradable composite hydrogels as bone substitutes: morphology and mechanical characterization.** *J Mater Sci* 2006, **17**:447-454.
38. Ignatius AA, Betz O, Augat P, Claes LE: **In Vivo Investigations on Composites Made of Resorbable Ceramics and Poly(lactide) Used as Bone Graft Substitutes.** *J Biomed Mater Res* 2001, **58**(6):701-709.

39. Williams DF: **Mechanisms of Biodegradation of Implantable Polymers.** *Clinical Materials* 1992, **10**:9-12.
40. Holmbom J, Södergård A, Ekholm E, Mårtson M, Kuusilehto A, Saukko P, Penttinen R: **Long-term evaluation of porous poly(ϵ -caprolactone-co-L-lactide) as a bone-filling material.** *J Biomed Mater Res* 2005, **75A**:308-315.
41. Böhner M: **Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements.** *Injury* 2000, **31**(4):37-47.
42. Hollinger JO, Battistone GC: **Biodegradable Bone Repair Materials. Synthetic Polymers and Ceramics.** *Clin Orthop Relat Res* 1986, **207**: 290-305.
43. De Groot K, **Degradable ceramics.** In: Williams, David Franklyn: *Biocompatibility of clinical implant materials*; Vol. 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1981:199-222.
44. Böhner M, Lemaître J, Van Landuyt P, Zambelli PY, Merkle HP, Gander B: **Gentamicin-Loaded Hydraulic Calcium Phosphate Bone Cement as Antibiotic Delivery System.** *J Pharm Sci* 1997, **86** (5):565-572.
45. Yu D, Wong J, Matsuda Y, Fox JL, Higuchi WI, Otsuka M: **Self-Setting Hydroxyapatite Cement: A Novel Skeletal Drug-Delivery System for Antibiotics.** *J Pharm Sci* 1992, **81**(6):529-531.
46. Cassidy C, Jupiter JB, Cohen M, Delli-Santi M, Fennell C, Leinberry C, Husband J, Ladd A, Seitz WR, Constanz B: **Norian SRS Cement Compared with Conventional Fixation in Distal Radius Fractures.** *J Bone Joint Surg* 2003, **85**(11):2127-2137.
47. Kuemmerle JM, Oberle A, Oechslin C, Böhner M, Frei C, Boecklen I, von Rechenberg B: **Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty- an experimental study in sheep.** *J Craniomaxillofac Surg* 2005, **33**(1):37-44.
48. Lu J, Deschamps M, Dejou J, Koubi G, Hardouin P, Lemaître J, Proust JP: **The Biodegradation Mechanism of Calcium Phosphate Biomaterials in Bone.** *J Biomed Mater Res* 2002, **63** (4):408-412.
49. Dupraz A, Delécrin J, Moreau A, Pilet P, Passuti N: **Long-term bone response to particulate injectable ceramic.** *J Biomed Mater Res* 1998, **42**:368-375.
50. Brown WE et al: **Dental Resorptive Cement Pastes.** United States Patent Number 4,518,430, 1985.
51. Driessens FCM, Verbeeck RMH: **Relation Between Physico-Chemical Solubility and Biodegradability of Calcium Phosphates.** In: *Implant Materials in Biofunction, Advances in Biomaterials Vol. 8.* De Putter C, de Lange GL, de Groot K, Lee AJC (Hrsg.), Amsterdam 1988:105-111.
52. Malard O, Bouler JM, Guicheux J, Heymann D, Pilet P, Coquard C, Daculsi G: **Influence of biphasic calcium phosphate granulometry on bone ingrowth, ceramic resorption, and inflammatory reactions: Preliminary *in vitro* and *in vivo* study.** *J Biomed Mater Res* 1999, **46**:103-111.
53. Frankenburg EP, Goldstein SA, Bauer TW, Harris SA, Poser RD: **Biomechanical and Histological Evaluation of a Calcium Phosphate Cement.** *J Bone Joint Surg* 1998, **80**(8) :1112-1124.
54. Ohura K, Böhner M, Hardouin P, Lemaître J, Pasquier G, Flautre B: **Resorption of, and bone formation from, new β -tricalcium phosphate- monocalcium phosphate cements: An *in vivo* study.** *J Biomed Mater Res* 1996, **30**:193-200.
55. Theiss F, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinsky K, Böhner M, Matter S, Frei C, Auer JA, von Rechenberg B: **Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement.** *Biomaterials* 2005, **26** (21):4383-4394.
56. Peltier LF: **The Use of Plaster of Paris To Fill Defects in Bone.** *Clin Orthop* 1961, **21**:1-31.

57. Carinci F, Pitarelli A, Stabellini G, Palmieri A, Scapoli L, Laino G, Caputi S, Pezzetti F: **Calcium Sulfate: Analysis of MG63 Osteoblast-like Cell Response by Means of a Microarray Technology.** *J Biomed Mater Res* 2004, **71B**:260-267.
58. Hadjipavlou AG, Simmons JW, Yang J, Nicodemus CL, Esch O, Simmons DJ: **Plaster of Paris as an Osteoconductive Material for Interbody Vertebral Fusion in Mature Sheep.** *Spine* 2000, Vol.**25**(1):10-16.
59. Cunniff PM, Fossey SA, Auerbach MA, Song JW, Kaplan DL, Adams WW, Eby RK, Mahoney D, Vezie DL: **Mechanical and Thermal Properties of Dragline Silk from the Spider *Nephila clavipes*.** *Polym Adv Technol*, 1994, **5**:401-410.
60. Altmann GH, Fiaz F, Jakuba C, Calabro T, Horan RL, Chen J, Lu H, Richmond J, Kaplan DL: **Silk-based biomaterials.** *Biomaterials* 2003, **24**: 401-416.
61. Hollander DH: **Interstitial cystitis and silk allergy.** *Med Hypotheses* 1994, **43**:155-156.
62. Wen CM, Ye ST, Zhou LX, Yu Y: **Silk-induced asthma in children: a report of 64 cases.** *Ann Allergy* 1990, **65**:375-378.
63. Rossitch E, Bullard DE, Oakes WJ: **Delayed foreign-body reaction to silk sutures in pediatric neurosurgical patients.** *Child's Nerv Syst* 1987, **3**:375-378.
64. Uebersax L, Hagenmüller H, Hofmann S, Gruenblatt E, Müller R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, Merkle HP, Meinel L: **Effect of scaffold design on bone morphology *in vitro*.** *Tissue Eng* 2006, **12**(12):3417-3429.
65. Cunniff PM, Fossey SA, Auerbach MA, Song JW, Kaplan DL, Adams WW, Eby RK, Mahony D, Vezie DL: **Mechanical and thermal properties of dragline silk from the spider *Nephila claviceps*.** *Polym Adv Technol* 1994, **5**:401-410.
66. Moy RL, et al.: **Commonly used suture materials in skin surgery.** *Am Fam Physician* 1991, **44**:2123-2128.
67. Karageorgiou V, Tomkins M, Fajardo R, Meinel L, Snyder B, Wade K, Chen J, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL: **Porous silk fibroin 3-D scaffolds for delivery of bone morphogenetic protein-2 *in vitro* and *in vivo*.** *J Biomed Mater Res* 2006, **78A**:324-334.
68. Fini M, Motta A, Torricelli P, Giavaresi G, Aldini NN, Tschon M, Giardino R, Migliaresi C: **The healing of confined critical size cancellous defects in the presence of silk fibroin hydrogel.** *Biomaterials* 2005, **26**:3527-3536.
69. Cassinelli C, Cascardo G, Morra M, Draghi L, Motta A, Catapano G: **Physical-chemical and biological characterization of silk-fibroin-coated porous membranes for medical applications.** *Int J Artif Organs*, 2006, **29**(9):881-889.
70. Hofmann S, Hagenmüller H, Koch AM, Müller R, Vunjak-Novankovic, Kaplan DL, Merkle HP, Meinel L: **Control of *in vitro* tissue-engineered bone-like structures using human mesenchymal stem cells and porous silk scaffolds.** *Biomaterials* 2007, **28**:1152-1162.
71. Greenwald D, Shumway S, Albear P, Gottlieb L: **Mechanical comparison of 10 suture materials before and after *in vivo* incubation.** *J Surg Res* 1994, **56**(4):372-377.
72. Bucknall TE, Teare L, Ellis H: **The choice of a suture to close abdominal incisions.** *Eur Surg Res* 1983, **15**:59-66.
73. Rossitch E Jr, Bullard DE, Oakes WJ: **Delayed foreign-body reaction to silk sutures in pediatric neurosurgical patients.** *Childs Nerv Sys* 1987, **3**:375-378.
74. Panilaitis B, Altman GH, Chen J, Jin HJ, Karageorgiou V, Kaplan DL: **Macrophage responses to silk.** *Biomaterials* 2003, **24**:3079-3085.

75. Meinel L, Betz O, Betz O, Fajardo R, Hofmann S, Nazarian A, Cory E, Hilbe M, McCool J, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Merkle HP, von Rechenberg B, Kaplan DL, Kirker-Head D: **Silk based biomaterials to heal critical sized femur defects.** *Bone* 2006, **39**:922-931.
76. Nunamaker DM: **Experimental Models of Fracture Repair.** *Clin Orthop Relat Res* 1998, **355S**:S56-S65.
77. Nuss KMR, Auer JA, Boos A, von Rechenberg B: **An animal model in sheep for biocompatibility testing of biomaterials in cancellous bone.** *BMC Musculoskelet Disord* 2006, **7**:67.
78. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG: **Animal models for implant biomaterial research in bone: a review.** *Eurpeas Cells and Materials* 2007, **13**:1-10.
79. Brodbeck W, MacEwan M, Colton E, Meyerson H, Anderson JM: **Lymphocytes and the foreign body response: Lymphocyte enhancement of macrophage adhesion and fusion.** *J Biomed Mater Res* 2005, **74A**:222-229.
80. Jenney CR, DeFife KM, Colton E, Anderson JM: **Human monocyte/macrophage adhesion, macrophage motility, and IL-4-induced foreign body giant cell formation on silane-modified surfaces *in vitro*.** *J Biomed Mater Res* 1998, **41**:171-184.
81. Pandey R, Quinn JMW, Sabokbar A, Athanasou NA: **Biophosphonate inhibition of bone resorption induced by particulate biomaterial-associated macrophages.** *Acta Orthop Scand* 1996, **67(3)**:221-228.
82. Sabokbar A, Pandey R, Quinn JMW, Athanasou NA: **Osteoclastic differentiation by mononuclear phagocytes containing biomaterial particles.** *Arch Orthop Trauma Surg* 1998, **117**:136-140.
83. Van Blitterswijk CA, Bakker D, Hesselink C, Koerten HK: **Reactions of cells at implant surfaces.** *Biomaterials* 1991, **12(2)**:187-193.
84. Brodbeck WG, Shive MS, Colton E, Nakayama Y, Matsuda T, Anderson JM: **Influence of biomaterial surface chemistry on the apoptosis of adherent cells.** *J Biomed Mater Res* 2001, **55**:661-668.
85. Gristina AG, Giridhar G, Gabriel BL, Naylor PT, Myrvik QN: **Cell biology and molecular mechanisms in artificial device infections.** *Int J Artif Organs* 1993, **16**:755-764.
86. Bos RRM, Rozema FR, Boering G, Nijenhuis AJ, Pennings AJ, Verwey AB, Nieuwenhuis P, Jansen HWB: **Degradation of and tissue reaction to biodegradable poly (L-lactide) for use as internal fixation of fractures: a study in rats.** *Biomaterials* 1991, **12**:32-36.
87. Smetana K, Holíková Z, Seitzer U, Haas H, Vacík J: **Synthetic Hydrogel Capacity to Induce Formation of Foreign-Body Giant Multinucleate Cells Differs *in Vivo* and *in Vitro*.** *Folia Biologica (Praha)* 2000, **46**:113-118.
88. Lemperle G, Morhenn VB, Pestonjamas V, Gallo RL: **Migration Studies and Histology of Injectable Microspheres of Different Sizes in Mice.** *Plast Reconstr Surg* 2004, **113(5)**:1380-1390.
89. Eid K, Zelicof S, Perona BP, Sledge CB, Glowacki J: **Tissue reactions to particles of bone-substitute materials in intraosseous and heterotopic sites in rats: discrimination of osteoinduction, osteocompatibility, and inflammation.** *J Orthop Res* 2001, **19**:962-969.
90. Frayssinet P, Gineste L, Conte P, Fages J, Rouquet N: **Short-term implantation effects of a DCPD-based calcium phosphate cement.** *Biomaterials* 1998, **19**:971-977.

91. Ooms EM, Wolke JGC, van der Waerden JPCM, Jansen JA: **Trabecular bone response to injectable calcium phosphate (Ca-P) cement.** *J Biomed Mater Res* 2002, **61**:9-18.
92. Flautre B, Delacour C, Blary MC, Van Landuyt P, Lemaître J, Hardouin P: **Volume effect on biological properties of a calcium phosphate hydraulic cement: experimental study in sheep.** *Bone* 1999 **25**(2):35-39.
93. Yablon IG: **The Effect of Methylmethacrylate on Fracture Healing.** *Clin Orthop Relat Res* 1976, **114**:358-363.
94. Paavolainen P, Karaharju E, Slätis P, Ahonen J, Homstöm T: **Effect of rigid plate fixation on structure and mineral content of cortical bone.** *Clin Orthop Relat Res* 1978, **136**:287-293.
95. Cornell CN, Lane J: **Newest Factors in Fracture Healing.** *Clin Orthop Relat Res* 1992, **277**:297-311.
96. Laquerriere P, Grandjean-Laquerriere A, Jallot E, Balossier G, Frayssinet P, Guenounou M: **Importance of hydroxyapatite particles characteristics on cytokines production by human monocytes *in vitro*.** *Biomaterials* 2003, **24**:2739-2747.
97. Bergsma EJ, Rozema FR, Bos RRM, de Bruijn WC: **Foreign Body Reactions to Resorbable Poly (L-lactide) Bone Plates and Screws Used for the Fixation of Unstable Zygomatic Fractures.** *J Oral Maxillofac Surg* 1993, **51**:666-670.
98. Goodman SB: **Does the Immune System Play a Role in Loosening and Osteolysis of Total Joint Replacements?** *J Long-Term Effects Med Implants* 1996, **6**(2):91-101.
99. Galante JO, Lemons J, Spector M, Wilson PD, Wright TM: **The Biologic Effects of Implant Materials.** *J Orthop Res* 1991, **9**(5):760-775.
100. Rücker M, Laschke MW, Junker D, Carvalho C, Schramm A, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD: **Angiogenic and inflammatory response to biodegradable scaffolds in dorsal skinfold chambers of mice.** *Biomaterials* 2006, **27**:5027-5038.
101. Köhler H: **Natürliche Widerstandskräfte gegen Krankheit.** In: *Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin*, Kitt T, Schulz LC (Hrsg.), Enke Verlag, Stuttgart, 1990:33-41.
102. Wang WB, Ferguson DJP, Quinn JWW, Simpson AHRW, Athanasou NA: **Biomaterial Particle Phagocytosis By Bone-Resorbing Osteoclasts.** *J Bone Joint Surg (Br)* 1997, **79B**:849-56.
103. Athanasou NA: **Current Concepts Review Cellular Biology of Bone-Resorbing Cells.** *J Bone Joint Surg* 1996, **78A**(7):1096-1111.
104. Yuan H, Li Y, de Bruijn JD, de Groot K, Zhang X: **Tissue responses of calcium phosphate cement: a study in dogs.** *Biomaterials* 2000, **21**:1283-1290.
105. Dersot JM, Colombier ML, Lafont J, Baroukh B, Septier D, Saffar JL: **Multinucleated Giant Cells Elicited Around Hydroxyapatite Particles Implanted in Craniotomy Defects Are not Osteoclasts.** *Anatomical Record* 1995, **242**:166-176.
106. Lassus J, Salo J, Jiranek WA, Santavirta S, Nevalainen J, Matucci-Cerinic M, Horák P, Konttinen Y: **Macrophage Activation Results in Bone Resorption.** *Clin Orthop Relat Res* 1998, **352**:7-15.
107. Zhao Q, Topham N, Anderson JM, Hiltner A, Lodoen G, Payet CR: **Foreign-body giant cells and polyurethane biostability: In vivo correlation of cell adhesion and surface cracking.** *J Biomed Mater Res* 1991, **25**:177-183.
108. Tang L, Eaton JW: **Natural Responses to Unnatural Materials: A Molecular Mechanism for Foreign Body Reactions.** *Molecular Medicine* 1999, **5**:351-358.
109. Vogel M, Voigt C, Knabe C, Radlanski RJ, Gross UM, Müller-Mai CM: **Development of multinuclear giant cells during the degradation of Bioglass® particles in rabbits.** *J Biomed Mater Res* 2004, **70A**:370-379.

110. Anderson JM: **Inflammatory Response to Implants.** *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1988, **34**:101-107.
111. DeFife KM, Jenney CR, Colton E, Anderson JM: **Disruption of filamentous actin inhibits human macrophage fusion.** *FASEB J* 1999, **13**: 823-832.
112. Mittermayer C, Eblenkamp M, Richter HA, Zwadlo-Klarwasser G, Bhardwaj RS, Klosterhalfen B: **Pathologie der Implantate.** Dt Gesellschaft für Chirurgie, Kongressband 2002:491-497.
113. Coleman DL, King RN, Andrade JD: **The Foreign Body Reaction: A Chronic Inflammatory Response.** *J Biomed Mater Res* 1974, **8**:199-211.
114. Anderson JM: **Inflammation and the Foreign Body Response.** *Prob Gen Surg* 1994, **11(2)**:147-160.
115. Kukita T, Kukita A: **Osteoclast differentiation antigen.** *Histol Histopathol* 1996, **11**:821-830.
116. Shen M, Garcia I, Maier RV, Horbett TA: **Effects of adsorbed proteins and surface chemistry on foreign body giant cell formation, tumor necrosis factor alpha release and procoagulant activity of monocytes.** *J Biomed Mater Res* 2004, **70A**:533-541.
117. Weiss C, Jelkmann W, **Funktionen des Blutes.** In: *Physiologie des Menschen*, Schmidt RF, Thews G (Hrsg.), Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 26. Auflage 1995:411-447.
118. Bayrhuber H, Kull U (Hrsg.): **Immunbiologie.** In: *Linder Biologie*, Schroedel-Verlag, 22. Auflage 2005:392-411.
119. Shankar R, Greisler HP: **Inflammation and Biomaterials. Implantation Biology.** R.S. Greco (Hrsg.). CRC Press, Boca Raton, Florida, 1994:68-77.
120. Hench LL, Xynos I, Polak JM: **Bioactive glasses for *in situ* tissue regeneration.** *J Biomater Sci Polymer Edn* 2004, **15(4)**:543-562.
121. Jenney CR, Anderson JM: **Effects of surface-coupled polyethylene oxide on human macrophage adhesion and foreign body giant cell formation in vitro.** *J Biomed Mater Res* 1994, **44**:206-216.
122. Lanyon LE, Hampson WGJ, Goodship AE, Shah JS: **Bone Deformation Recorded *in Vivo* From Strain Gauges Attached To The Human Tibial Shaft.** *Acta Orthop Scand* 1975, **46**:256-268.
123. Nickel R, Schummer A, Seiferle E: **Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band 1.** Verlag Parey, Berlin und Hamburg. 6.Auflage, 1992:128-202.
124. Schenk RK: **Zur Problematik der Knochenersatzstoffe: Histophysiologie des Knochenumbaus und der Substitution von Knochenersatzstoffen.** *Hefte zur Unfallheilkunde* 1991, **216**:23-35
125. Stürmer KM, Schuchardt W: **Neue Aspekte der gedeckten Marknagelung und des Aufbohrens der Markhöhle im Tierexperiment.** *Unfallheilkunde* 1980, **83**:433-445.
126. Fadeeva IV, Barinov SM, Komlev VS, Fedotov DA, Durisin J, Medvecky L: **Apatite formation in the reaction-setting mixture of Ca(OH)₂-KH₂PO₄ system.** *J Biomed Mater Res* 2004, **70A**:303-308.
127. Apfel, T: **Biokompatibilitätsstudie von Seiden-Scaffolds an Schafen.** Pferdeklinik der Vetsuisse Fakultät Zürich, Universität Zürich, 2009.
128. Blumenfeld I, Gaspar R, Laufer D, Livne E: **Enhancement of Toluidine Blue Staining by Transforming Growth Factor- β , Insulin-Like Growth Factor and Growth Hormone in the Temporomandibular Joint of Aged Mice.** *Cells Tissues Organs* 2000, **167**:121-129.

129. Sugiki T, Uyama T, Toyoda M, Morioka H, Kume S, Miyado K, Matsumoto K, Saito H, Tsumaki N, Takahashi Y, Toyama Y, Umezawa A: **Hyaline Cartilage Formation and Enchondral Ossification Modeled with KUM5 and OP Chondroblasts.** *J Cell Biochem* 2007, **100**:1240-1254.
130. Compston JE, Vedi S, Webb A: **Relationship between Toluidine Blue-Stained Calcification Fronts and Tetracycline-Labeled Surfaces in Normal Human Iliac Crest Biopsies.** *Calcif Tissue Int* 1985, **37**:32-35.
131. Geyer G, Linss W: **Toluidine blue staining of cartilage proteoglycan subunits.** *Acta histochemica* 1978, **61**:127-134.
132. Bain SD, Impeduglia TM, Rubin CT: **Cement Line Stain in Undecalcified Thin Sections of Cortical Bone.** *Stain Technology* 1990, **65(4)**:159-163.
133. Willert HG, Bertram H, Buchhorn GH: **Osteolysis in Alloarthroplasty of the Hip.** *Clin Orthop Relat Res* 1990, **258**:108-121.

9 Abkürzungsverzeichnis

BMP	Bone Morphogenetic Protein
Ca	Kalzium
CaP1 – CaP11	Kalzium-Phosphat-Präparate unterschiedlicher Zusammensetzung
CSH	Kalziumsulfat-Hemihydrat
DCPD	Dikalzium-dihydrate Zemente, Brushite
ETHZ	Eidgenössische Technische Hochschule Zürich, Schweiz
F	Hydrogelträger auf Fibrinbasis
GH	Growth Hormone
H1- H18	Hydrogelpräparate unterschiedlicher Zusammensetzung
hMS	Humane mesenchymale Stammzellen
i.m.	Intramuskulär
i.v.	Intravenös
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
L1 - L4	Lymphozyten in den Zonen 1-4 des Bohrloches
IL	Interleukin
M1 –M4	Makrophagen in den Zonen 1-4 des Bohrloches
MCSF	Macrophage Colony Stimulating- Factor
MHC	Major Histokompatibilitätsmoleküle
MMA	Methylmetacrylat
MPS	Monozytäres Phagozytose System
P	Phosphor
P1 – P4	Plasmazellen in den Zonen 1-4 des Bohrloches
p.o.	per os
PEG	Polyethylenglykol
PHA	Precipitated Hydroxyapatite
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTH	Parathormon
RZ1 –RZ4	Mehr kernige Riesenzellen in den Zonen 1-4 des Bohrloches
S	Hydrogelträger synthetischer Herkunft (Polyethylenglykol)
s.c.	Subcutan
S1-S6	Seidenpräparate unterschiedlicher Zusammensetzung
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAP	Tartrat Resistant Acid Phosphatase
Tufts	Tufts University, Massachusetts, United States of America
β-TCP	Beta-Trikalziumphosphat

10 Annex

10.1.Tabellen

Tabelle 1: Verteilung der Hydrogele (H1 - H18)

Material	Zusatz	Schaf-Nr.	Lokalisation
H1, Fibrin	PTH, Iohexal, Thrombin	2404	Humerus links distal
			Femur rechts proximal
		2406	Femur links proximal
			Humerus rechts distal
		2408	Humerus links distal
			Femur rechts proximal
H2, Fibrin	PTH, Iohexal, Thrombin	2404	Humerus links proximal
			Femur rechts distal
		2406	Humerus links distal
			Femur rechts proximal
		2408	Humerus links proximal
			Femur rechts distal
H3, Fibrin	Iohexal, Thrombin	2405	Humerus links distal
			Femur rechts proximal
		2407	Femur links distal
			Humerus rechts proximal
		2409	Femur links proximal
			Humerus rechts distal
H4, Fibrin	Iohexal, Thrombin	2405	Humerus links proximal
			Femur rechts distal
		2407	Femur links proximal
			Humerus rechts distal
		2409	Humerus links distal
			Femur rechts proximal
H5, Fibrin	PTH, Thrombin	2404	Femur links distal
			Humerus rechts proximal
		2406	Humerus links proximal
			Femur rechts distal
		2408	Femur links distal
			Humerus rechts proximal
H6, Fibrin	PTH, Thrombin	2404	Femur links proximal
			Humerus rechts distal
		2406	Femur links distal
			Humerus rechts proximal
		2408	Femur links proximal
			Humerus rechts distal
H7, Fibrin	Thrombin	2405	Femur links distal
			Humerus rechts proximal
		2407	Humerus links distal
			Femur rechts proximal
		2409	Humerus links proximal
			Femur rechts distal
H8, Fibrin	Thrombin	2405	Femur links proximal
			Humerus rechts distal
		2407	Humerus links proximal
			Femur rechts distal
		2409	Femur links distal
			Humerus rechts proximal
H9, Fibrin	BMP-2	1204	Humerus links proximal
			Femur links distal
			Humerus rechts proximal
			Humerus rechts distal
			Femur rechts proximal
			Femur rechts distal
H10, Fibrin	PTH	1206	Humerus links proximal
			Femur rechts distal
		1208	Humerus links proximal
			Humerus links distal
			Femur links proximal
			Femur links distal
			Humerus rechts proximal

			Humerus rechts distal
			Femur rechts proximal
			Femur rechts distal
		1209	Femur rechts distal
H11, PEG	BMP-2	1209	Femur links distal
H12, PEG	BMP-2	1205	Humerus links distal
			Femur links proximal
			Femur links distal
			Humerus rechts proximal
			Humerus rechts distal
			Femur rechts proximal
			Femur rechts distal
		1209	Humerus rechts proximal
H13, PEG	BMP-2	1207	Humerus rechts proximal
			Humerus rechts distal
			Femur rechts proximal
			Femur rechts distal
H14, PEG	BMP-2	1209	Humerus links distal
			Femur links proximal
			Humerus rechts distal
			Femur rechts proximal
H15, PEG	BMP-2	1209	Humerus links proximal
H16, PEG	BMP-2	1207	Humerus links proximal
			Humerus links distal
			Femur links proximal
			Femur links distal
H17, PEG	BMP-2	1205	Humerus links proximal
H18, PEG		1204	Femur links distal
			Humerus rechts proximal
	BMP-2	1204	Humerus links distal
			Femur links proximal
			Humerus rechts distal
			Femur rechts proximal
			Femur rechts distal

Tabelle 2: Verteilung der Kalzium-Phosphat Verbindungen (CaP1 – CaP11)

Material	Schaf-Nr.	Lokalisation
CaP1 Brushite	2501	Humerus links distal
		Humerus rechts proximal
	2502	Femur links proximal
		Femur rechts distal
	2503	Femur links distal
		Humerus rechts distal
CaP2 Brushite X-9	804	Humerus links proximal
		Humerus rechts proximal
		Humerus rechts distal
	806	Femur rechts proximal
		Femur links proximal
		Femur rechts distal
CaP3 chronOS™-Inject	804	Femur links distal
		Femur rechts proximal
		Femur rechts distal
	806	Humerus links proximal
		Humerus links distal
		Humerus rechts distal
	839	Humerus rechts proximal
		Femur rechts proximal
		Femur rechts distal

	842	Humerus links distal
		Femur links proximal
		Femur links distal
CaP4 Brushite mit Granula	2501	Humerus links proximal
		Humerus rechts distal
	2502	Humerus links distal
		Humerus rechts proximal
	2503	Femur links proximal
		Femur rechts proximal
CaP5 Norian Reinforced®	2501	Femur links distal
		Femur rechts proximal
	2502	Humerus links proximal
		Humerus rechts distal
	2503	Humerus links distal
		Femur rechts distal
	804	Humerus links distal
	806	Femur links distal
CaP6 Biobon®	839	Humerus links proximal
		Femur links proximal
		Femur links distal
	842	Humerus rechts distal
		Femur rechts proximal
		Femur rechts distal
CaP7 Kalziumsulfat	2501	Femur links proximal
		Femur rechts distal
	2502	Femur links distal
		Femur rechts proximal
	2503	Humerus links proximal
		Humerus rechts proximal
Blöcke aus beta-TCP		
CaP8 TCP Poren 150µm	864	Femur links proximal
		Humerus rechts proximal
	865	Tibia links proximal
		Femur rechts distal
	866	Humerus links proximal
		Femur rechts proximal
CaP9 Poren 240µm	864	Femur links distal
	865	Femur links proximal
		Humerus rechts proximal
	866	Tibia links proximal
		Femur rechts distal
CaP10 Poren 510µm	864	Humerus links proximal
		Femur rechts proximal
	865	Femur links distal
		Tibia rechts proximal
	866	Femur links proximal
		Humerus rechts proximal
CaP11 Poren 1220µm	864	Tibia links proximal
		Femur rechts distal
	865	Humerus links proximal
		Femur rechts proximal
	866	Femur links distal
		Tibia rechts proximal

Tabelle 3: Verteilung der Seidenmatrices (S1 - S6)

Material	Schaf-Nr.	Lokalisation		
S1 Paraffin tufts	3101	Humerus links distal		
		Femur links distal		
		Humerus rechts proximal		
		Femur rechts proximal		
	3102	Femur rechts distal		
		3103	Femur rechts proximal	
	S2 Paraffin ethz	3101	Humerus links proximal	
			Femur links proximal	
Humerus rechts distal				
Femur rechts distal				
3102		Humerus rechts proximal		
		3103	Femur rechts distal	
S3 Salz tufts		3102	Humerus links distal	
			Femur links distal	
	Humerus rechts distal			
	3103		Humerus links distal	
	3103	Femur links proximal		
		Humerus rechts proximal		
		S4 Salz ethz	3102	Humerus links proximal
				Femur links proximal
Femur rechts proximal				
3103	Humerus links proximal			
	Femur links distal			
	Humerus rechts distal			

Tabelle 4: Durchschnittliche Anzahl der Lymphozyten je Material und Region in Prozent

Material	Mittelwert/ Standardabweichung Zone 1	Mittelwert/ Standardabweichung Zone 2	Mittelwert / Standardabweichung Zone 3	Mittelwert/ Standardabweichung Zone 4
CaP1		1.9 ± 3.15	0.91 ± 2.01	0.16 ± 0.25
CaP2		4.9 ± 3.04	4.0 ± 3.88	1.2 ± 2.41
CaP3	1.42 ± 1.76	4.18 ± 2.42	1.3 ± 1.65	0.08 ± 0.19
CaP4		3.0 ± 3.81	0.67 ± 1.2	0.08 ± 0.2
CaP5			2.14 ± 5.66	1,78 ± 2.78
CaP6	0.53 ± 0.02	0.68 ± 0.27	0.91 ± 1.11	0
CaP7	1.18 ± 1.59	0.5 ± 0.5	0.59 ± 1.19	0
CaP8	2.44 ± 3.06	1.27 ± 1.84	1.44 ± 2.08	0.68 ± 1.5
CaP9	2.51 ± 1.09	2.11 ± 1.22	0.92 ± 1.18	0.31 ± 0.26
CaP10	3.67 ± 2.25	2.58 ± 2.05	0.91 ± 0.2	0.6 ± 1.19
CaP11	2.68 ± 2.56	1.92 ± 1.18	0.77 ± 0.24	0.45 ± 0.22
H1	6.5 ± 5.06	12.35 ± 23.49	1.7 ± 4.06	0.01 ± 0.02
H2	8.98 ± 15.45	4.44 ± 5.62	1.55 ± 2.93	0.01 ± 0.04
H3	4.16 ± 7.23	1.51 ± 2.37	0.9 ± 1.19	0
H4	5.25 ± 3.93	3.0 ± 2.93	0.79 ± 0.88	0.03 ± 0.04
H5	4.93 ± 8.49	10.21 ± 16.8	4.64 ± 8.67	3.1 ± 6.65
H6	14.02 ± 18.14	8.71 ± 12.27	0.93 ± 0.97	4.03 ± 8.92
H7	4.41 ± 4.85	3.75 ± 4.46	1.59 ± 2.00	0.08 ± 0.2
H8	11.91 ± 9.63	19.16 ± 26.29	0.45 ± 0.44	10.83 ± 26.53
H9	3.0 ± 2.0	1.88 ± 2.08	1.6 ± 1.29	0.11 ± 0.24
H10	5.2 ± 7.86	1.23 ± 1.68	0.42 ± 0.46	0.22 ± 0.44
H12	15.0 ± 21.21	2.5 ± 2.66	6.35 ± 4.33	0.45 ± 0.94
H13	1.52 ± 2.33	1.13 ± 1.01	1.63 ± 1.38	0.75 ± 1.19
H14	3.51 ± 2.56	2.88 ± 2.22	3.62 ± 2.75	0.01 ± 0.02
H16	5.18 ± 4.72	2.2 ± 2.85	2.51 ± 4.31	0
H18	7.92 ± 6.89	8.78 ± 10.49	14.5 ± 24.67	0.42 ± 0.44
S1	20.63 ± 26.55	12.01 ± 12.96	10.76 ± 14.81	0.01 ± 0.02
S2	10.27 ± 13.67	3.6 ± 3.96	3.66 ± 1.77	0.17 ± 0.4
S3	15.58 ± 22.02	14.83 ± 22.48	3.5 ± 4.88	0
S4	32.59 ± 29.33	43.75 ± 19.21	12.83 ± 23.15	0.83 ± 2.04
Leer	2.17 ± 4.1	0.5 ± 0.31	0.25 ± 0.41	0

Tabelle 5: Durchschnittliche Anzahl Plasmazellen je Material und Region in Prozent

Material	Mittelwert / Standardabweichung Zone 1	Mittelwert / Standardabweichung Zone 2	Mittelwert / Standardabweichung Zone 3	Mittelwert / Standardabweichung Zone 4
CaP1		0.1 ± 0.22	0.09 ± 0.22	0
CaP2		0.71 ± 0.26	0.32 ± 0.43	0
CaP3	0.1 ± 0.22	0.47 ± 0.40	0.05 ± 0.14	0.04 ± 0.14
CaP4		0	0	0
CaP5			0	0.35 ± 0.94
CaP6	0.01 ± 0.02	0.16 ± 0.28	0.09 ± 0.22	0
CaP7	0.16 ± 0.28	0.01 ± 0.02	0	0
CaP8	1.6 ± 2.21	0.51 ± 1.21	0.33 ± 0.4	0.2 ± 0.39
CaP9	0.83 ± 0.95	0.34 ± 0.26	0.13 ± 0.23	0.02 ± 0.02
CaP10	1.35 ± 1.33	0.51 ± 0.43	0.18 ± 0.26	0.08 ± 0.2
CaP11	0.84 ± 1.16	0.7 ± 1.15	0.44 ± 0.37	0
H1	0.75 ± 1.17	0.5 ± 1.22	0 ± 0.02	0
H2	0.16 ± 0.4	0 ± 0.02	0.2 ± 0.04	0
H3	0.25 ± 0.28	0.03 ± 0.04	0	0
H4	0.42 ± 0.36	0.09 ± 0.2	0 ± 0.02	0
H5	0.42 ± 0.41	0.12 ± 0.24	0	0.02 ± 0.02
H6	0.33 ± 0.42	0.24 ± 0.26	0.1 ± 0.22	0
H7	0.22 ± 0.27	0.19 ± 0.25	0.1 ± 0.22	0
H8	0.44 ± 0.34	0.27 ± 0.4	0 ± 0.02	0.08 ± 0.2
H9	0.66 ± 0.28	0.16 ± 0.25	0.32 ± 0.27	0
H10	0.28 ± 0.35	0.29 ± 0.82	0 ± 0.01	0.01 ± 0.02
H12	2.5 ± 3.53	2.07 ± 2.24	0.87 ± 1.04	0 ± 0.01
H13	0.27 ± 0.29	0.15 ± 0.23	0.25 ± 0.28	0.75 ± 1.5
H14	0	0.01 ± 0.02	0.12 ± 0.25	0
H16	0.5 ± 0.5	0.18 ± 0.27	0.16 ± 0.28	0
H18	0.5 ± 0.5	1.01 ± 1.79	0.64 ± 1.1	0
S1	0.51 ± 0.56	1.75 ± 2.21	1.01 ± 1.4	0
S2	0.27 ± 0.26	0.27 ± 0.41	0.86 ± 1.1	0 ± 0.02
S3	1.28 ± 1.84	1.85 ± 2.05	1.5 ± 2.16	0 ± 0.02
S4	1.25 ± 1.88	2.75 ± 2.28	2.26 ± 2.3	0.16 ± 0.4
Leer	0.1 ± 0.19	0.25 ± 0.26	0 ± 0.02	0

**Tabelle 6: Durchschnittliche Anzahl mehrkerniger Riesenzellen je Material und Region
in Prozent**

Material	Mittelwert / Standardabweichung Zone 1	Mittelwert / Standardabweichung Zone 2	Mittelwert / Standardabweichung Zone 3	Mittelwert / Standardabweichung Zone 4
CaP1		0	0	0.26 ± 0.25
CaP2		0.11 ± 0.21	1.41 ± 1.3	0.61 ± 0.4
CaP3	0.25 ± 0.41	2.55 ± 3.0	1.64 ± 1.21	1.51 ± 1.56
CaP4		0	0	0.25 ± 0.41
CaP5	0	0	0.21 ± 0.39	0.14 ± 0.24
CaP6	5.33 ± 5.0	2.66 ± 2.51	1.91 ± 2.95	0.76 ± 1.12
CaP7	0	0.1 ± 0.22	0.41 ± 0.49	0.08 ± 0.2
CaP8	0.08 ± 0.2	1.94 ± 2.57	2.76 ± 2.91	2.35 ± 2.21
CaP9	1.81 ± 2.13	2.51 ± 2.28	1.82 ± 2.12	1.91 ± 1.32
CaP10	0.67 ± 1.16	1.18 ± 1.29	0.35 ± 0.25	1.25 ± 1.4
CaP11	0.25 ± 0.41	1.26 ± 1.35	0.83 ± 0.25	2.34 ± 2.92
H1	1.25 ± 3.06	0.08 ± 0.2	1.34 ± 1.31	1.5 ± 2.04
H2	0	0.166 ± 0.4	0.42 ± 0.37	1.6 ± 1.53
H3	0	0	0.27 ± 0.26	1.65 ± 2.23
H4	0	0	0.25 ± 0.28	0.67 ± 1.2
H5	2.5 ± 5.59	0.2 ± 0.44	0.91 ± 1.23	0.92 ± 1.23
H6	1.5 ± 3.35	0.01 ± 0.02	0.11 ± 0.21	1.21 ± 1.45
H7	0	0.16 ± 0.4	0.45 ± 0.37	0.01 ± 0.02
H8	5.83 ± 9.17	0	0.34 ± 0.51	0.2 ± 0.26
H9	0	0	0.12 ± 0.24	0.13 ± 0.23
H10	0.01 ± 0.03	0.33 ± 0.82	0.29 ± 0.35	0.57 ± 1.0
H12	5.0 ± 7.07	3.5 ± 5.72	1.92 ± 1.85	0.5 ± 0.95
H13	0.25 ± 0.5	0.12 ± 0.25	0.76 ± 0.27	0.76 ± 1.17
H14	0	5.12 ± 1.82	2.52 ± 2.02	0.01 ± 0.02
H16	0	0.16 ± 0.28	0.2 ± 0.25	0
H18	0.07 ± 0.18	1.21 ± 1.99	1.51 ± 2.55	0.37 ± 0.38
S1	16.87 ± 9.43	11.87 ± 4.73	5.37 ± 3.9	0.16 ± 0.26
S2	32.5 ± 18.64	25.42 ± 17.05	5.44 ± 4.55	0.03 ± 0.05
S3	27.91 ± 14.69	20.0 ± 12.14	3.33 ± 4.08	0.01 ± 0.04
S4	28.33 ± 28.7	15.0 ± 9.35	6.41 ± 9.87	0.17 ± 0.4
Leer	3.33 ± 8.16	0.08 ± 0.2	0.68 ± 1.16	1.16 ± 1.29

Tabelle 7: Durchschnittliche Anzahl Makrophagen je Material und Region in Prozent

Material	Mittelwert / Standardabweichung Zone 1	Mittelwert / Standardabweichung Zone 2	Mittelwert / Standardabweichung Zone 3	Mittelwert / Standardabweichung Zone 4
CaP1				
CaP2				
CaP3	9.17 ± 10.55	13.33 ± 8.01	10.83 ± 5.16	2.83 ± 2.92
CaP4				
CaP5				
CaP6	5.17 ± 2.25	3.52 ± 1.3	6.66 ± 1.44	0.66 ± 0.28
CaP7	6.67 ± 7.63	15.0 ± 5.0	7.00 ± 11.25	1.83 ± 2.75
CaP8	6.08 ± 3.72	9.33 ± 8.25	9.75 ± 6.11	5.33 ± 4.8
CaP9	9.0 ± 3.35	8.0 ± 1.11	7.6 ± 4.54	6.1 ± 2.7
CaP10	4.5 ± 1.8	6.67 ± 2.04	6.25 ± 2.09	4.35 ± 3.14
CaP11	7.58 ± 7.0	8.33 ± 2.58	9.16 ± 3.41	8.0 ± 2.73
H1	12.08 ± 4.0	19.58 ± 9.27	17.5 ± 10.12	9.16 ± 5.4
H2	8.43 ± 5.04	16.0 ± 11.31	19.58 ± 13.82	12.91 ± 4.85
H3	12.75 ± 15.14	7.63 ± 5.99	13.75 ± 2.5	7.5 ± 3.53
H4	10.0 ± 5.0	8.75 ± 3.79	12.5 ± 4.47	6.33 ± 2.94
H5	11.5 ± 5.75	14.0 ± 10.98	11.5 ± 3.35	8.0 ± 1.11
H6	20.5 ± 12.04	20.00 ± 6.12	16.0 ± 2.23	11.0 ± 5.75
H7	8.5 ± 2.23	10.0 ± 3.53	12.0 ± 5.7	7.1 ± 4.9
H8	17.92 ± 9.27	10.08 ± 4.3	13.33 ± 4.08	8.83 ± 5.97
H9	3.5 ± 3.6	5.33 ± 4.5	6.0 ± 2.59	0.36 ± 0.27
H10	2.9 ± 3.27	4.33 ± 2.96	3.0 ± 2.13	1.22 ± 1.69
H12	25.0 ± 35.35	35.0 ± 14.12	17.5 ± 3.53	4.0 ± 4.94
H13	1.88 ± 2.09	0.75 ± 0.5	3.01 ± 3.17	1.75 ± 1.19
H14	11.0 ± 6.92	16.67 ± 2.88	19.16 ± 1.44	3.00 ± 2.00
H16	3.83 ± 3.32	2.25 ± 2.5	2.33 ± 2.3	0.5 ± 0.5
H18	8.57 ± 6.43	22.14 ± 8.09	18.57 ± 9.44	6.64 ± 4.94
S1	7.5 ± 2.88	11.88 ± 3.75	10.0 ± 7.07	3.12 ± 2.39
S2	10.0 ± 4.74	11.67 ± 9.44	11.75 ± 6.11	3.08 ± 1.85
S3	11.67 ± 3.76	10.00 ± 4.47	7.5 ± 1.58	1.59 ± 1.22
S4	6.67 ± 5.84	8.83 ± 3.34	8.5 ± 5.42	2.83 ± 2.01
Leer	1.31 ± 2.1	1.2 ± 2.13	0.9 ± 1.24	1.71 ± 3.24

Tabelle 8: Korrelationen Hydrogele nach Spearman (n= 85)

Korrelationen			L1	P1	RZ1	M1
Spearman-Rho	L1	Korrelationskoeffizient	1.000	.644**	.344**	.530**
		Sig. (2-seitig)	.	.000	.002	.000
		N	76	76	76	76
	P1	Korrelationskoeffizient	.644**	1.000	.229*	.308**
		Sig. (2-seitig)	.000	.	.046	.007
		N	76	76	76	76
	RZ1	Korrelationskoeffizient	.344**	.229*	1.000	.269*
		Sig. (2-seitig)	.002	.046	.	.019
		N	76	76	76	76
	M1	Korrelationskoeffizient	.530**	.308**	.269*	1.000
		Sig. (2-seitig)	.000	.007	.019	.
		N	76	76	76	76

			L2	P2	RZ2	M2
Spearman-Rho	L2	Korrelationskoeffizient	1.000	.389**	.086	.440**
		Sig. (2-seitig)	.	.000	.435	.000
		N	85	85	85	85
	P2	Korrelationskoeffizient	.389**	1.000	.157	.273*
		Sig. (2-seitig)	.000	.	.151	.011
		N	85	85	85	85
	RZ2	Korrelationskoeffizient	.086	.157	1.000	.271*
		Sig. (2-seitig)	.435	.151	.	.012
		N	85	85	85	85
	M2	Korrelationskoeffizient	.440**	.273*	.271*	1.000
		Sig. (2-seitig)	.000	.011	.012	.
		N	85	85	85	85

L = Lymphozyten, M = Makrophagen, P = Plasmazellen, RZ= mehrkernige Riesenzellen
 1= Zone 1, Zentrum des Bohrloches
 2= Zone 2, Mitte des Bohrloches
 3= Zone 3, Übergang Bohrloch – alter Knochen
 4= Zone 4. Bereich außerhalb des Bohrloches in altem Knochen

			L3	P3	RZ3	M3
Spearman-Rho	L3	Korrelationskoeffizient	1.000	.754	.417	-.131
		Sig. (2-seitig)	.	.083	.410	.804
		N	6	6	6	6
	P3	Korrelationskoeffizient	.754	1.000	.424	.283
		Sig. (2-seitig)	.083	.	.402	.586
		N	6	6	6	6
	RZ3	Korrelationskoeffizient	.417	.424	1.000	.707
		Sig. (2-seitig)	.410	.402	.	.116
		N	6	6	6	6
	M3	Korrelationskoeffizient	-.131	.283	.707	1.000
		Sig. (2-seitig)	.804	.586	.116	.
		N	6	6	6	6

			L4	P4	RZ4	M4
Spearman-Rho	L4	Korrelationskoeffizient	1.000	.523**	.102	.272*
		Sig. (2-seitig)	.	.000	.348	.011
		N	86	86	86	86
	P4	Korrelationskoeffizient	.523**	1.000	.072	.078
		Sig. (2-seitig)	.000	.	.510	.473
		N	86	86	86	86
	RZ4	Korrelationskoeffizient	.102	.072	1.000	.393**
		Sig. (2-seitig)	.348	.510	.	.000
		N	86	86	86	86
	M4	Korrelationskoeffizient	.272*	.078	.393**	1.000
		Sig. (2-seitig)	.011	.473	.000	.
		N	86	86	86	86

** . Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

* . Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

L = Lymphozyten, M = Makrophagen, P = Plasmazellen, RZ= mehrkernige Riesenzellen
 1= Zone 1, Zentrum des Bohrloches
 2= Zone 2, Mitte des Bohrloches
 3= Zone 3, Übergang Bohrloch – alter Knochen
 4= Zone 4. Bereich außerhalb des Bohrloches in altem Knochen

Tabelle 9: Korrelationen Kalzium-Phosphat-Verbindungen nach Spearman (n= 71)

Korrelationen			L1	P1	RZ1	M1
Spearman-Rho	L1	Korrelationskoeffizient	1.000	.856**	.021	.188
		Sig. (2-seitig)	.	.000	.903	.271
		N	36	36	36	36
	P1	Korrelationskoeffizient	.856**	1.000	.031	.175
		Sig. (2-seitig)	.000	.	.860	.308
		N	36	36	36	36
	RZ1	Korrelationskoeffizient	.021	.031	1.000	.048
		Sig. (2-seitig)	.903	.860	.	.780
		N	36	36	36	36
	M1	Korrelationskoeffizient	.188	.175	.048	1.000
		Sig. (2-seitig)	.271	.308	.780	.
		N	36	36	36	36

			L2	P2	RZ2	M2
Spearman-Rho	L2	Korrelationskoeffizient	1.000	.694**	.065	.358**
		Sig. (2-seitig)	.	.000	.633	.006
		N	57	57	57	57
	P2	Korrelationskoeffizient	.694**	1.000	.171	.314*
		Sig. (2-seitig)	.000	.	.204	.017
		N	57	57	57	57
	RZ2	Korrelationskoeffizient	.065	.171	1.000	-.004
		Sig. (2-seitig)	.633	.204	.	.977
		N	57	57	57	57
	M2	Korrelationskoeffizient	.358**	.314*	-.004	1.000
		Sig. (2-seitig)	.006	.017	.977	.
		N	57	57	57	57

L = Lymphozyten, M = Makrophagen, P = Plasmazellen, RZ= mehrkernige Riesenzellen
 1= Zone 1, Zentrum des Bohrloches
 2= Zone 2, Mitte des Bohrloches
 3= Zone 3, Übergang Bohrloch – alter Knochen
 4= Zone 4. Bereich außerhalb des Bohrloches in altem Knochen

			L3	P3	RZ3	M3
Spearman-Rho	L3	Korrelationskoeffizient	1.000	.581**	.457**	.463**
		Sig. (2-seitig)	.	.000	.000	.000
		N	69	69	69	69
	P3	Korrelationskoeffizient	.581**	1.000	.234	.339**
		Sig. (2-seitig)	.000	.	.053	.004
		N	69	69	69	69
	RZ3	Korrelationskoeffizient	.457**	.234	1.000	.476**
		Sig. (2-seitig)	.000	.053	.	.000
		N	69	69	69	69
	M3	Korrelationskoeffizient	.463**	.339**	.476**	1.000
		Sig. (2-seitig)	.000	.004	.000	.
		N	69	69	69	69

			L4	P4	RZ4	M4
Spearman-Rho	L4	Korrelationskoeffizient	1.000	.407**	.306*	.460**
		Sig. (2-seitig)	.	.001	.011	.000
		N	69	69	69	69
	P4	Korrelationskoeffizient	.407**	1.000	.248*	.255*
		Sig. (2-seitig)	.001	.	.040	.035
		N	69	69	69	69
	RZ4	Korrelationskoeffizient	.306*	.248*	1.000	.651**
		Sig. (2-seitig)	.011	.040	.	.000
		N	69	69	69	69
	M4	Korrelationskoeffizient	.460**	.255*	.651**	1.000
		Sig. (2-seitig)	.000	.035	.000	.
		N	69	69	69	69

** . Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

* . Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

L = Lymphozyten, M = Makrophagen, P = Plasmazellen, RZ= mehrkernige Riesenzellen
 1= Zone 1, Zentrum des Bohrloches
 2= Zone 2, Mitte des Bohrloches
 3= Zone 3, Übergang Bohrloch – alter Knochen
 4= Zone 4. Bereich außerhalb des Bohrloches in altem Knochen

Tabelle 10: Korrelationen Seidenpräparate nach Spearman (n = 22)

Korrelationen			L1	P1	RZ1	M1
Spearman-Rho	L1	Korrelationskoeffizient	1.000	.513*	-.302	-.060
		Sig. (2-seitig)	.	.015	.172	.790
		N	22	22	22	22
	P1	Korrelationskoeffizient	.513*	1.000	-.275	.354
		Sig. (2-seitig)	.015	.	.215	.106
		N	22	22	22	22
	RZ1	Korrelationskoeffizient	-.302	-.275	1.000	.038
		Sig. (2-seitig)	.172	.215	.	.867
		N	22	22	22	22
	M1	Korrelationskoeffizient	-.060	.354	.038	1.000
		Sig. (2-seitig)	.790	.106	.867	.
		N	22	22	22	22

			L2	P2	RZ2	M2
Spearman-Rho	L2	Korrelationskoeffizient	1.000	.461*	.039	-.112
		Sig. (2-seitig)	.	.031	.863	.618
		N	22	22	22	22
	P2	Korrelationskoeffizient	.461*	1.000	-.376	-.166
		Sig. (2-seitig)	.031	.	.085	.459
		N	22	22	22	22
	RZ2	Korrelationskoeffizient	.039	-.376	1.000	.022
		Sig. (2-seitig)	.863	.085	.	.924
		N	22	22	22	22
	M2	Korrelationskoeffizient	-.112	-.166	.022	1.000
		Sig. (2-seitig)	.618	.459	.924	.
		N	22	22	22	22

L = Lymphozyten, M = Makrophagen, P = Plasmazellen, RZ= mehrkernige Riesenzellen
 1= Zone 1, Zentrum des Bohrloches
 2= Zone 2, Mitte des Bohrloches
 3= Zone 3, Übergang Bohrloch – alter Knochen
 4= Zone 4. Bereich außerhalb des Bohrloches in altem Knochen

			L3	P3	RZ3	M3
Spearman-Rho	L3	Korrelationskoeffizient	1.000	.591**	.632**	.272
		Sig. (2-seitig)	.	.004	.002	.221
		N	22	22	22	22
	P3	Korrelationskoeffizient	.591**	1.000	.197	-.082
		Sig. (2-seitig)	.004	.	.379	.717
		N	22	22	22	22
	RZ3	Korrelationskoeffizient	.632**	.197	1.000	.561**
		Sig. (2-seitig)	.002	.379	.	.007
		N	22	22	22	22
	M3	Korrelationskoeffizient	.272	-.082	.561**	1.000
		Sig. (2-seitig)	.221	.717	.007	.
		N	22	22	22	22

			L4	P4	RZ4	M4
Spearman-Rho	L4	Korrelationskoeffizient	1.000	.532*	.197	.391
		Sig. (2-seitig)	.	.011	.379	.072
		N	22	22	22	22
	P4	Korrelationskoeffizient	.532*	1.000	-.266	-.064
		Sig. (2-seitig)	.011	.	.232	.778
		N	22	22	22	22
	RZ4	Korrelationskoeffizient	.197	-.266	1.000	.406
		Sig. (2-seitig)	.379	.232	.	.061
		N	22	22	22	22
	M4	Korrelationskoeffizient	.391	-.064	.406	1.000
		Sig. (2-seitig)	.072	.778	.061	.
		N	22	22	22	22

** . Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

* . Die Korrelation ist auf dem 0,05 Niveau signifikant (zweiseitig).

L = Lymphozyten, M = Makrophagen, P = Plasmazellen, RZ= mehrkernige Riesenzellen
 1= Zone 1, Zentrum des Bohrloches
 2= Zone 2, Mitte des Bohrloches
 3= Zone 3, Übergang Bohrloch – alter Knochen
 4= Zone 4. Bereich außerhalb des Bohrloches in altem Knochen

Tabelle 11: Korrelationen Leerkontrollen nach Spearman (n = 6)

Korrelationen			L1	P1	RZ1	M1
Spearman-Rho	L1	Korrelationskoeffizient	1.000	.172	.664	.667
		Sig. (2-seitig)	.	.744	.150	.148
		N	6	6	6	6
	P1	Korrelationskoeffizient	.172	1.000	.141	.802
		Sig. (2-seitig)	.744	.	.789	.055
		N	6	6	6	6
	RZ1	Korrelationskoeffizient	.664	.141	1.000	.655
		Sig. (2-seitig)	.150	.789	.	.158
		N	6	6	6	6
	M1	Korrelationskoeffizient	.667	.802	.655	1.000
		Sig. (2-seitig)	.148	.055	.158	.
		N	6	6	6	6

			L2	P2	RZ2	M2
Spearman-Rho	L2	Korrelationskoeffizient	1.000	.754	.417	-.131
		Sig. (2-seitig)	.	.083	.410	.804
		N	6	6	6	6
	P2	Korrelationskoeffizient	.754	1.000	.424	.283
		Sig. (2-seitig)	.083	.	.402	.586
		N	6	6	6	6
	RZ2	Korrelationskoeffizient	.417	.424	1.000	.707
		Sig. (2-seitig)	.410	.402	.	.116
		N	6	6	6	6
	M2	Korrelationskoeffizient	-.131	.283	.707	1.000
		Sig. (2-seitig)	.804	.586	.116	.
		N	6	6	6	6

L = Lymphozyten, M = Makrophagen, P = Plasmazellen, RZ= mehrkernige Riesenzellen
 1= Zone 1, Zentrum des Bohrloches
 2= Zone 2, Mitte des Bohrloches
 3= Zone 3, Übergang Bohrloch – alter Knochen
 4= Zone 4. Bereich außerhalb des Bohrloches in altem Knochen

			L3	P3	RZ3	M3
Spearman-Rho	L3	Korrelationskoeffizient	1.000	.696	-.308	.431
		Sig. (2-seitig)	.	.125	.553	.393
		N	6	6	6	6
	P3	Korrelationskoeffizient	.696	1.000	-.133	.664
		Sig. (2-seitig)	.125	.	.802	.150
		N	6	6	6	6
	RZ3	Korrelationskoeffizient	-.308	-.133	1.000	.103
		Sig. (2-seitig)	.553	.802	.	.846
		N	6	6	6	6
	M3	Korrelationskoeffizient	.431	.664	.103	1.000
		Sig. (2-seitig)	.393	.150	.846	.
		N	6	6	6	6

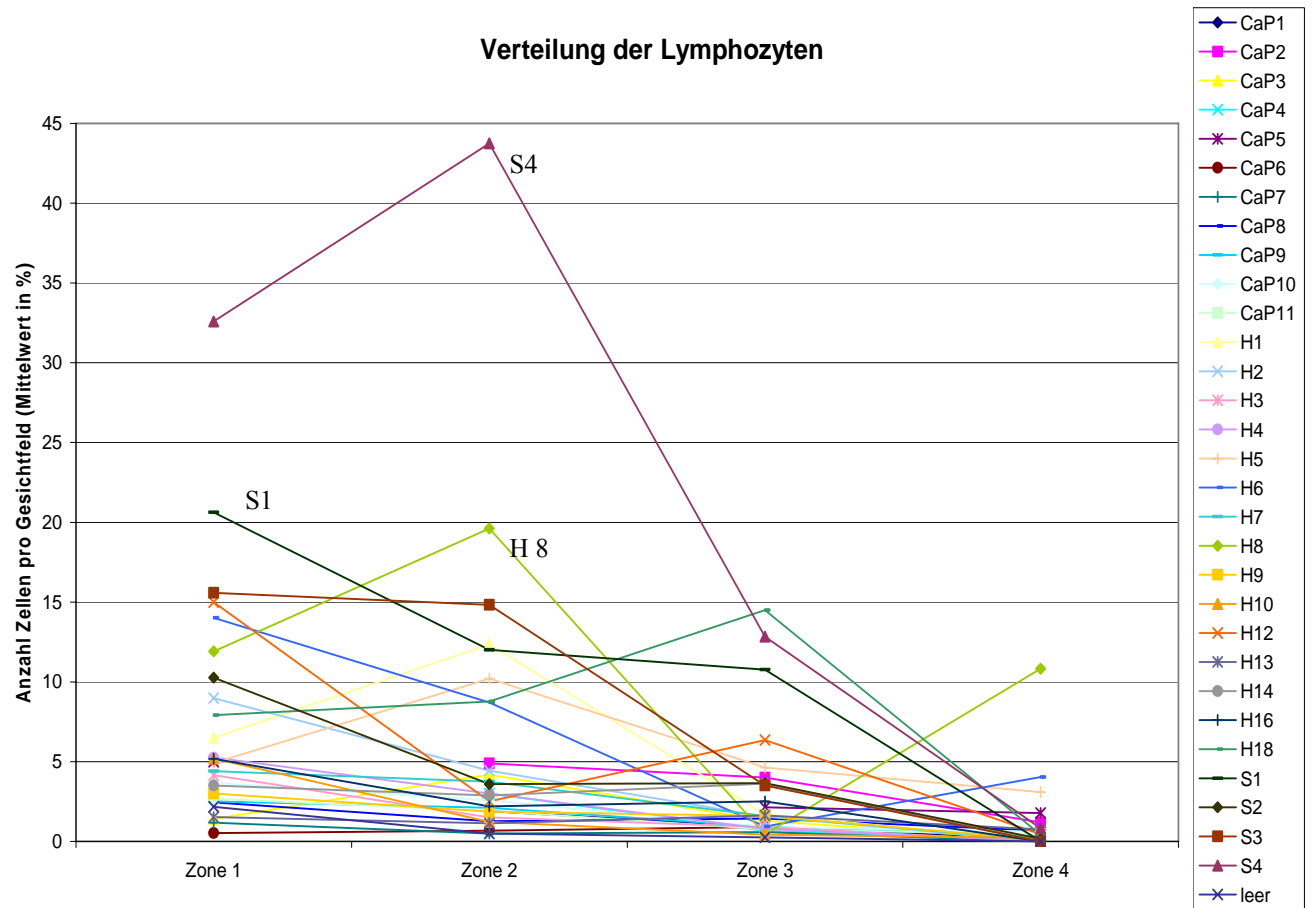
			L4	P4	RZ4	M4
Spearman-Rho	L4	Korrelationskoeffizient
		Sig. (2-seitig)
		N	6	6	6	5
	P4	Korrelationskoeffizient
		Sig. (2-seitig)
		N	6	6	6	5
	RZ4	Korrelationskoeffizient	.	.	1.000	1.000**
		Sig. (2-seitig)
		N	6	6	6	5
	M4	Korrelationskoeffizient	.	.	1.000**	1.000
		Sig. (2-seitig)
		N	5	5	5	5

** . Die Korrelation ist auf dem 0,01 Niveau signifikant (zweiseitig).

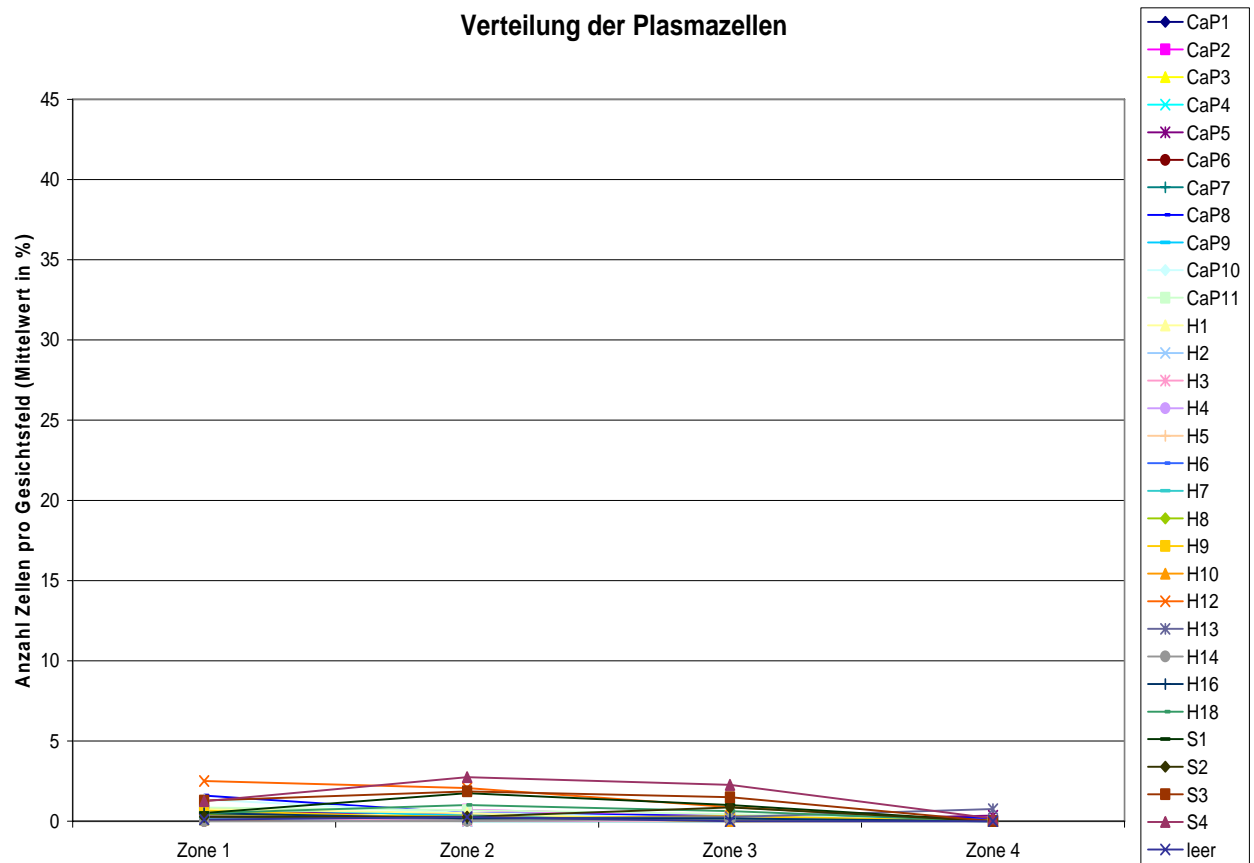
L = Lymphozyten, M = Makrophagen, P = Plasmazellen, RZ= mehrkernige Riesenzellen
 1= Zone 1, Zentrum des Bohrloches
 2= Zone 2, Mitte des Bohrloches
 3= Zone 3, Übergang Bohrloch – alter Knochen
 4= Zone 4. Bereich außerhalb des Bohrloches in altem Knochen

10.2. Graphische Darstellung der Resultate

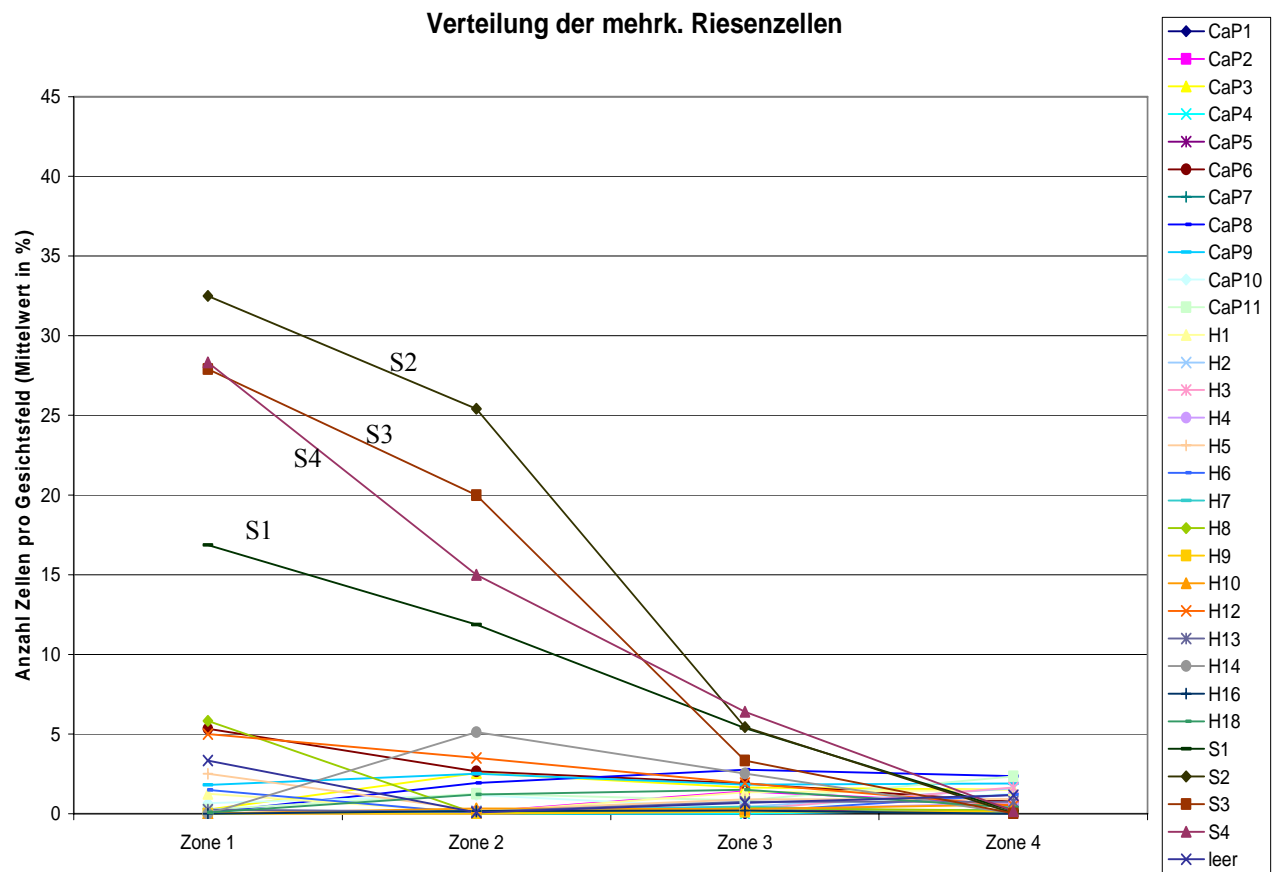
Grafik 1: Verteilung der Lymphozyten je Material und Region (Mittelwerte in Prozent)



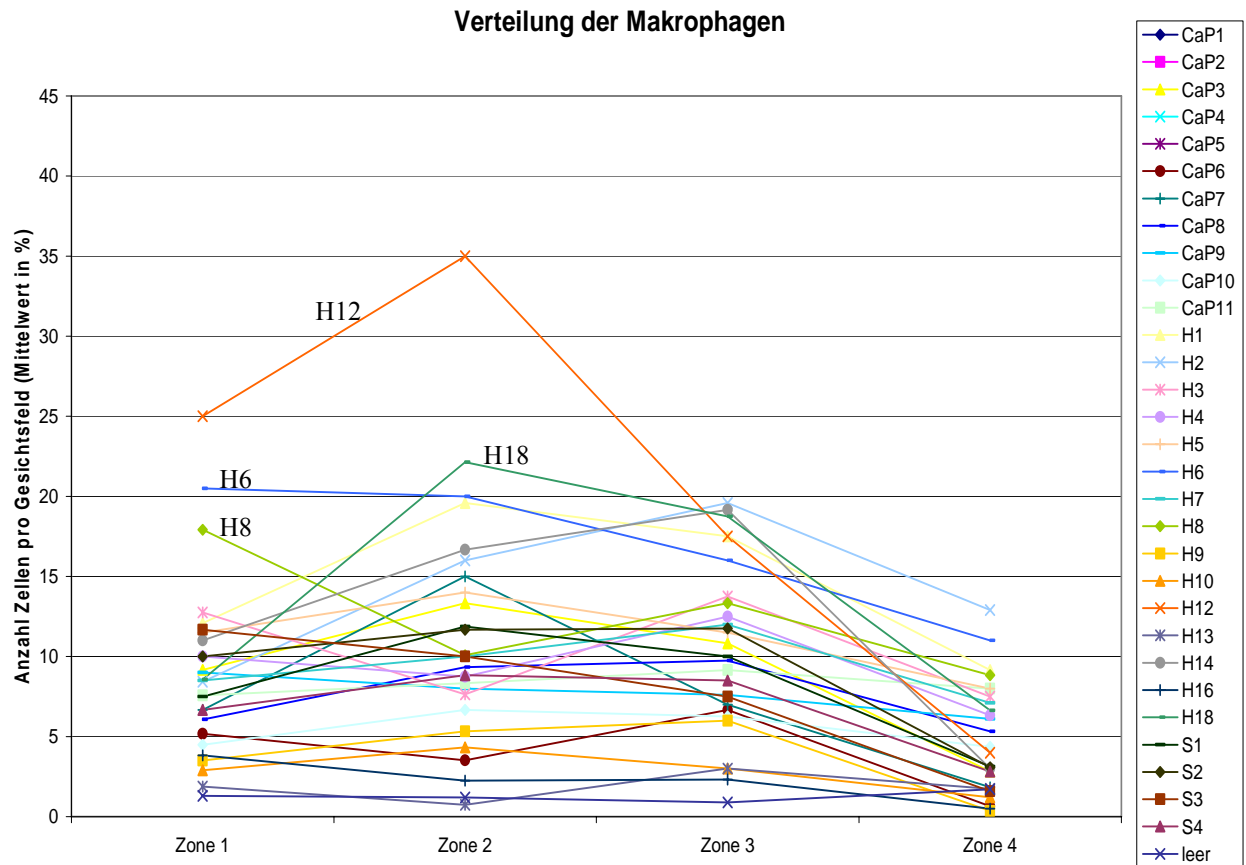
Grafik 2: Verteilung der Plasmazellen je Material und Region (Mittelwerte in Prozent)



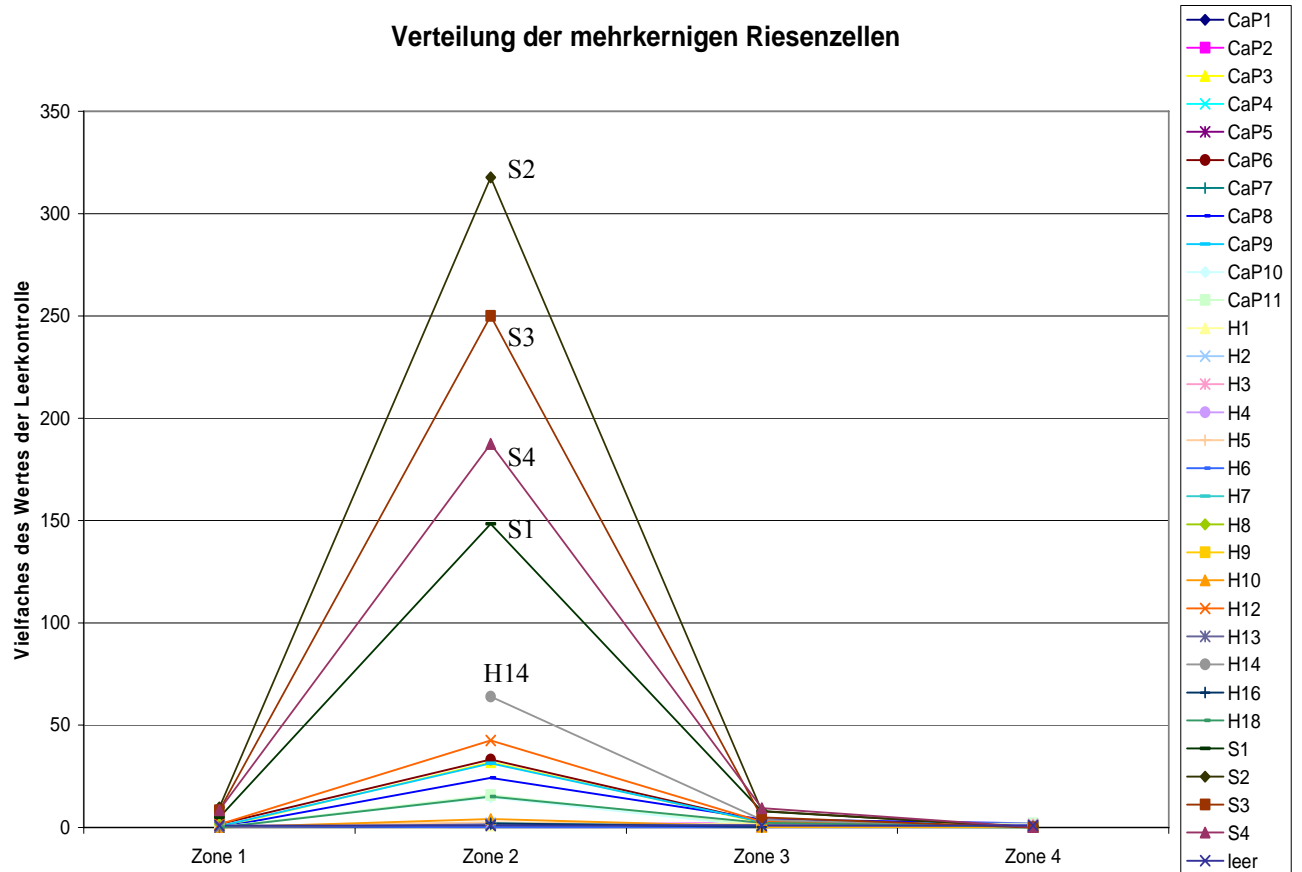
Grafik 3: Verteilung der mehrkernigen Riesenzellen je Material und Region
(Mittelwerte in Prozent)



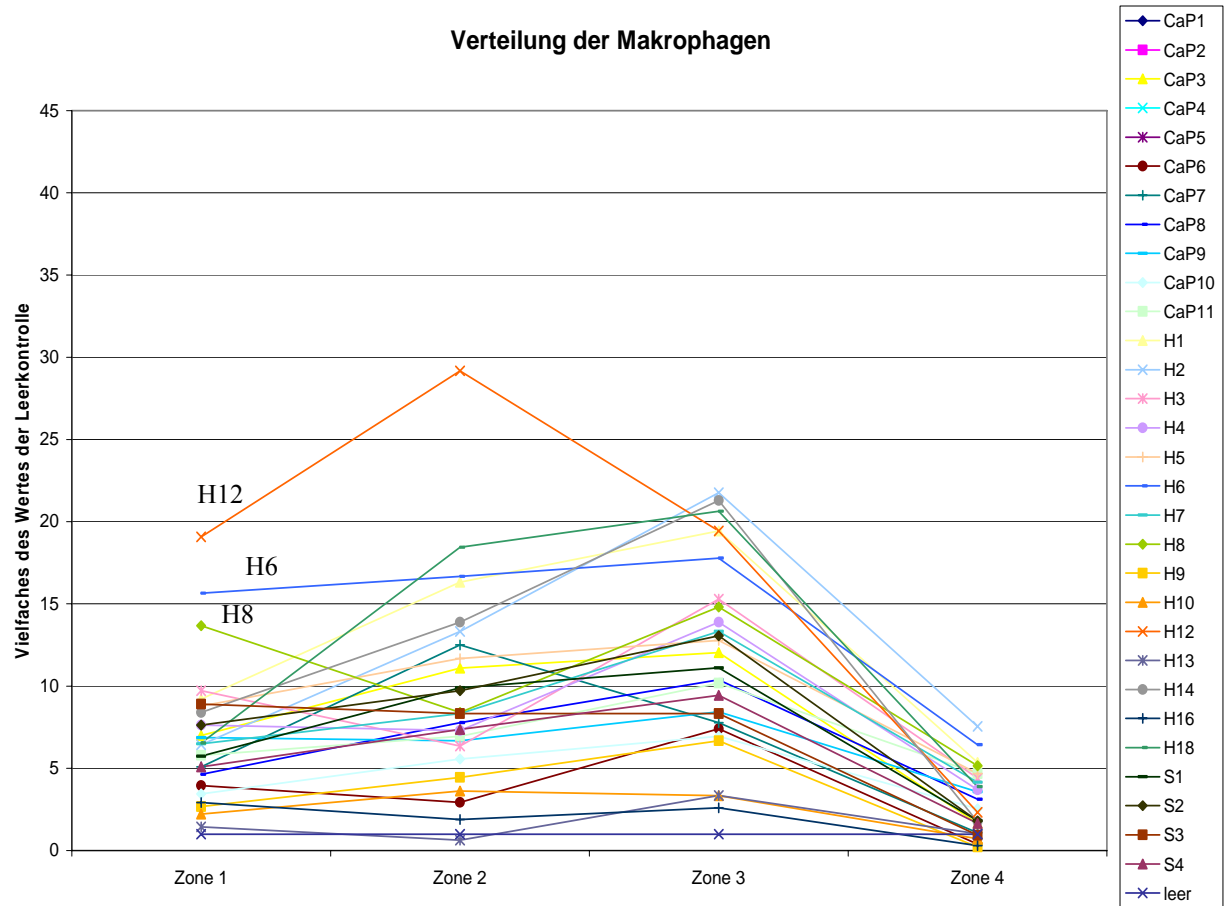
Grafik 4: Verteilung der Makrophagen je Material und Region (Mittelwerte in Prozent)



Grafik 5: Vielfaches der mehrkernigen Riesenzellen je Material und Region bezogen auf die Leerkontrolle (Leerwert = 1)

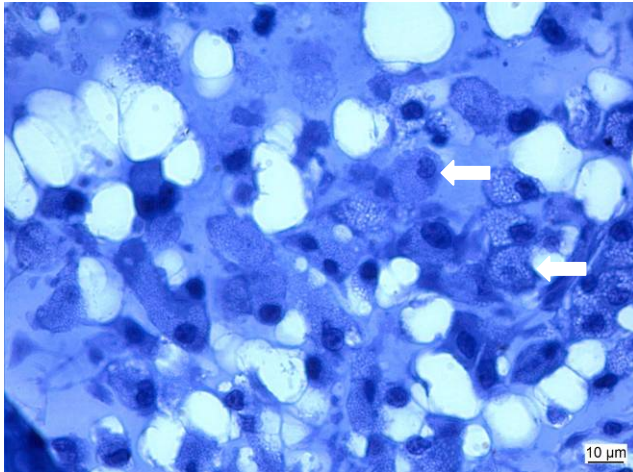


Grafik 6: Vielfaches der Makrophagen je Material und Region bezogen auf die Leerkontrolle (Leerwert = 1)



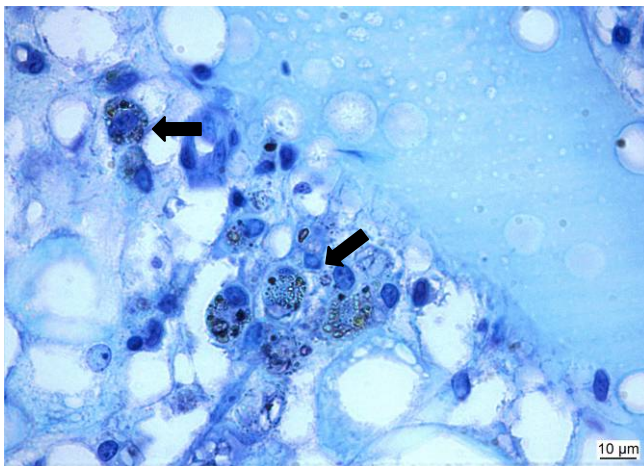
10.3. Abbildungen

Abb. 4



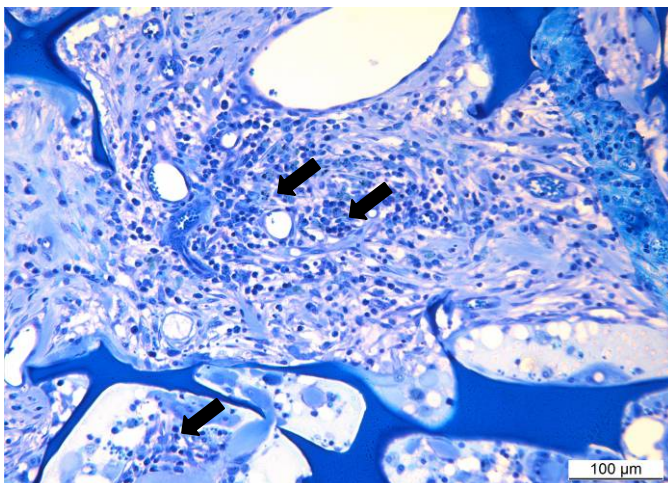
Makrophagen (Pfeile) nach Resorption von
Hydrogel
Zone 2
Schaf Nr. 1204

Abb. 5



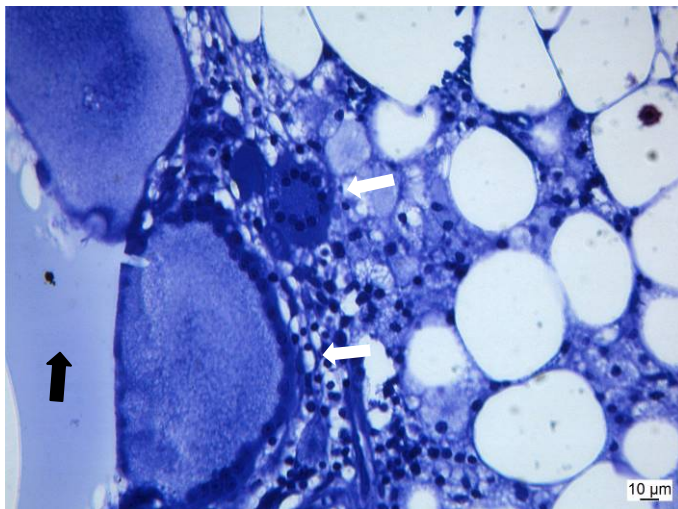
Makrophagen (Pfeile) nach
Zementresorption
Zone 1
Schaf Nr. 864

Abb. 6



Makrophagen (Pfeile) nach
Resorption von Seide im lockeren
Bindegewebe
Zone 2
Schaf Nr. 3103

Abb. 7

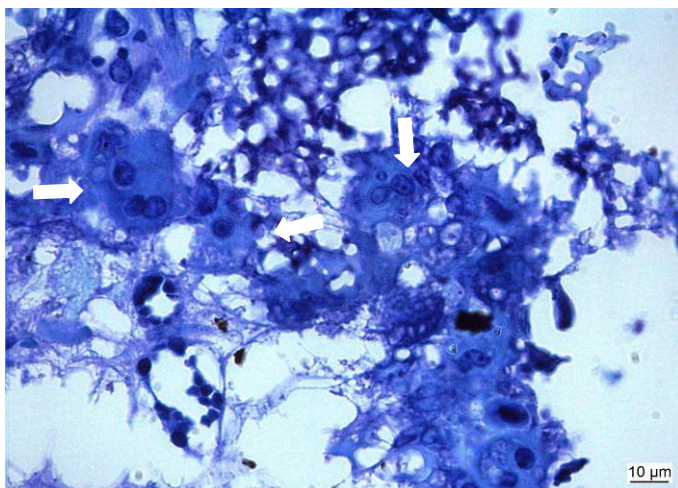


Mehrernige Riesenzellen (weiße Pfeile)
bei Hydrogel (schwarzer Pfeil), die
Zellkerne liegen teilweise hufeisenförmig
angeordnet im Zytoplasma

Zone 1

Schaf Nr. 1205

Abb. 8

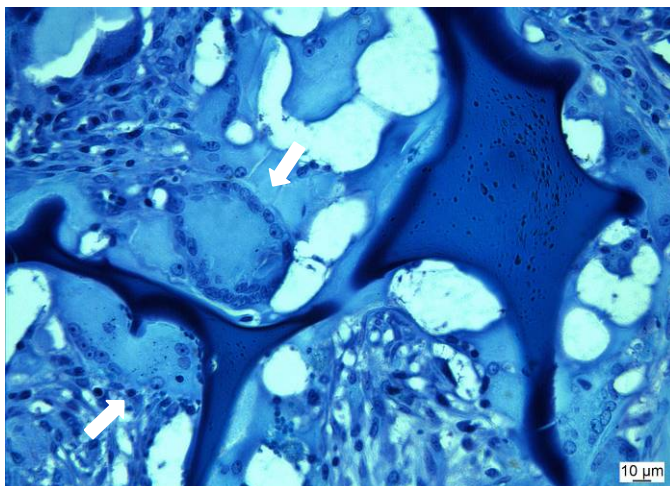


Mehrernige Riesenzellen (Pfeile) an
β-TCP- Zement

Zone 2

Schaf Nr. 864

Abb. 9

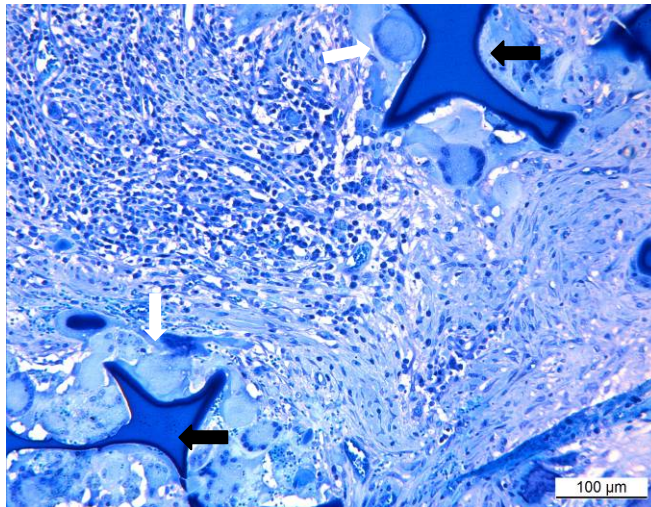


Große mehrernige Riesenzellen
(Pfeile) mit ovalen Nuclei und gut
abgrenzbaren Nucleoli unmittelbar an
Resten der Seidenmatrix liegend

Zone 1

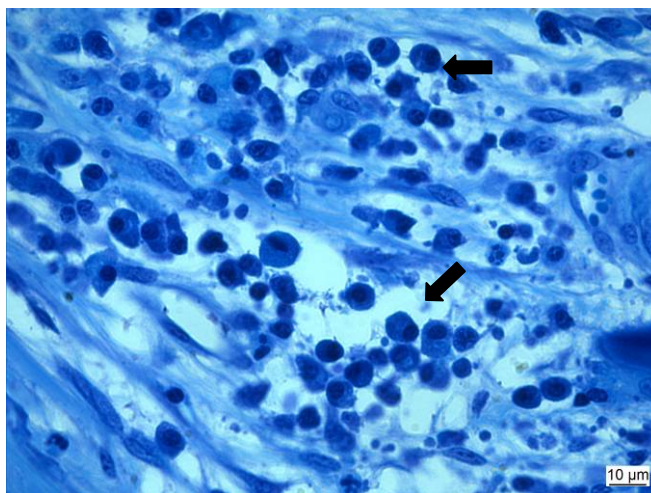
Schaf Nr. 3103

Abb. 10



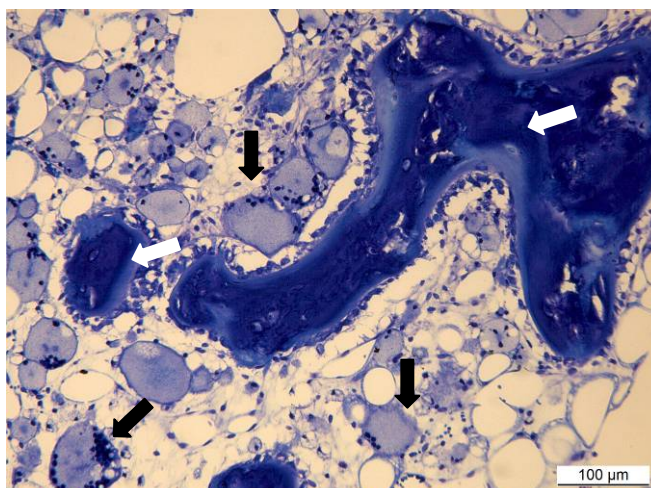
Lymphozyten, zahlreich im Bindegewebe
neben Seidenrest (schwarze Pfeile).
Seidenrest wird von mehrkernigen
Riesenzellen umschlossen (weiße Pfeile)
Zone 2
Schaf Nr. 3103

Abb. 11



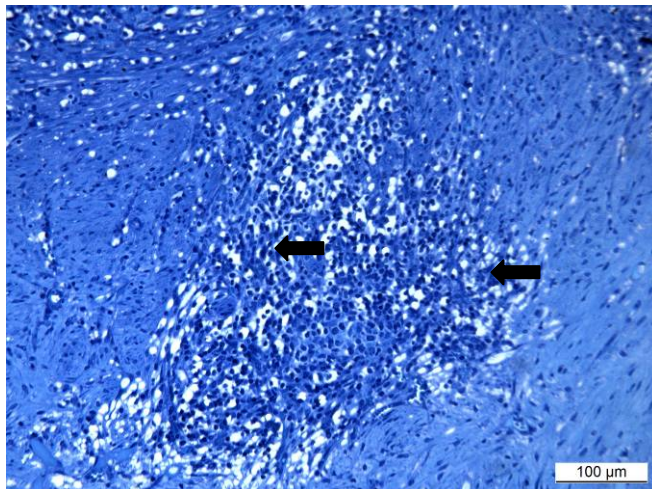
Plasmazellen (Pfeile) im Bindegewebe
Zone 3
Schaf Nr. 3102

Abb. 12



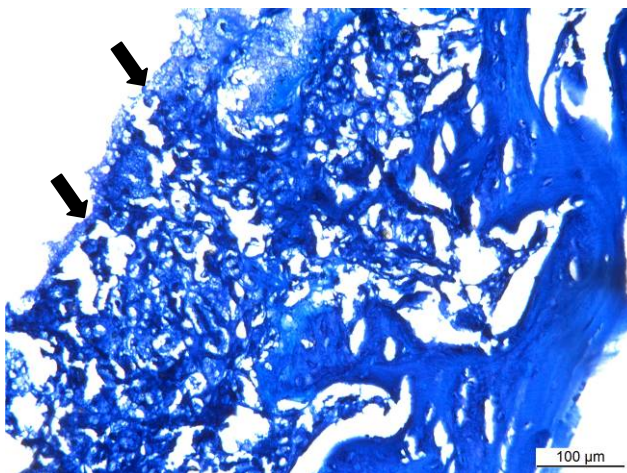
Mehrkernige Riesenzellen (Pfeile)
mit schaumigem Zytoplasma
(Hydrogel-Partikel), daneben neuer
Knochen (weiße Pfeile)
Zone 2
Schaf Nr. 1209

Abb. 13



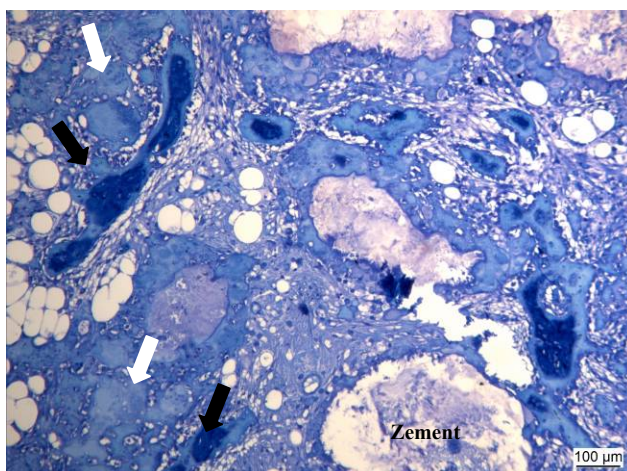
Cluster von Lymphozyten (Pfeile)
Zone 2
Schaf Nr. 2406

Abb. 14



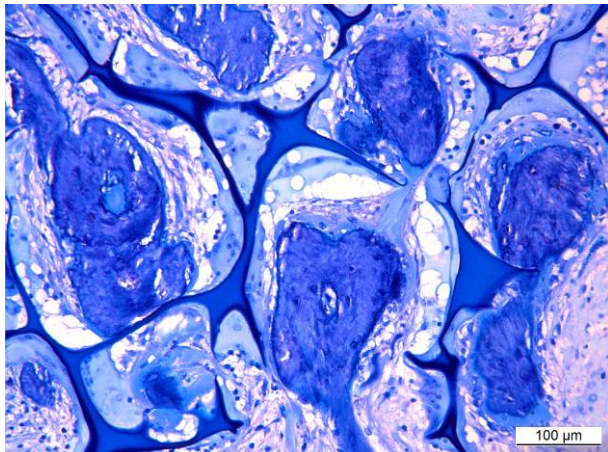
Reste von Norian-Zement (Pfeil) mit
Makrophagen
Zone 3
Schaf Nr. 2502

Abb. 15



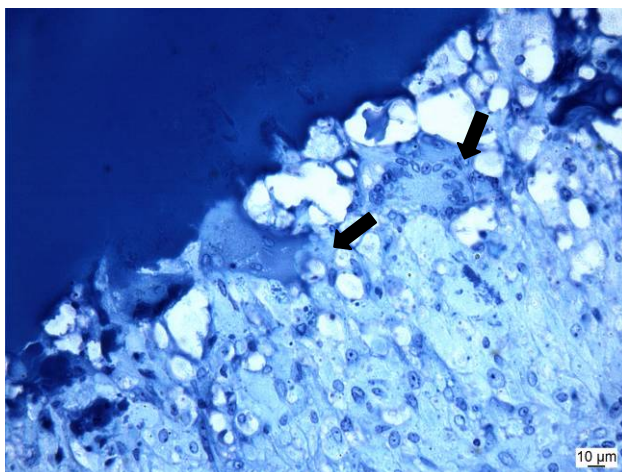
Bildung von neuem Knochen
(schwarze Pfeile), daneben
Makrophagen und mehrkernige
Riesenzellen (weiße Pfeile) an
Zementresten.
Zone 1
Schaf Nr. 842

Abb. 16



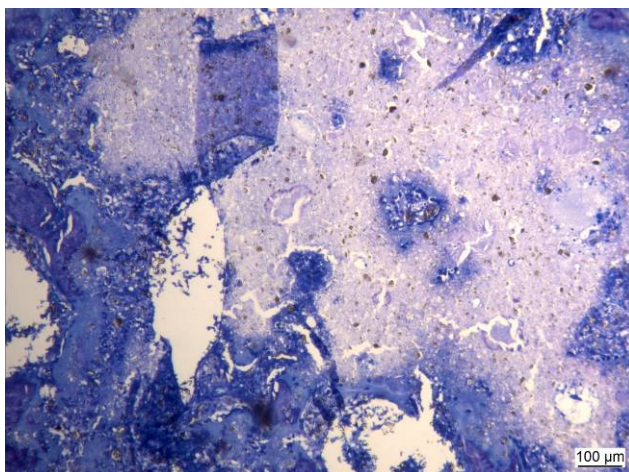
Seidenreste von mehrkernigen
Riesenzellen umschlossen,
dazwischen neu gebildete
Knochensubstanz
Zone 1
Schaf 3102

Abb. 17



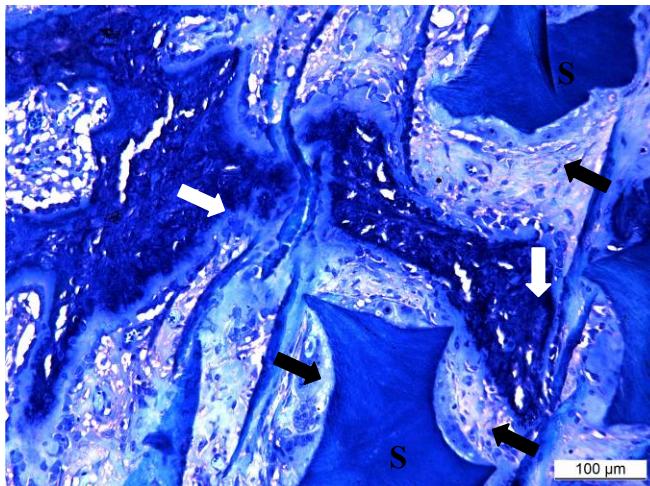
Hydrogel von mehrkernigen Riesenzellen
(Pfeile) umschlossen, jedoch keine
Lymphozyten oder Plasmazellen
Zone 1
Schaf 2407

Abb. 18



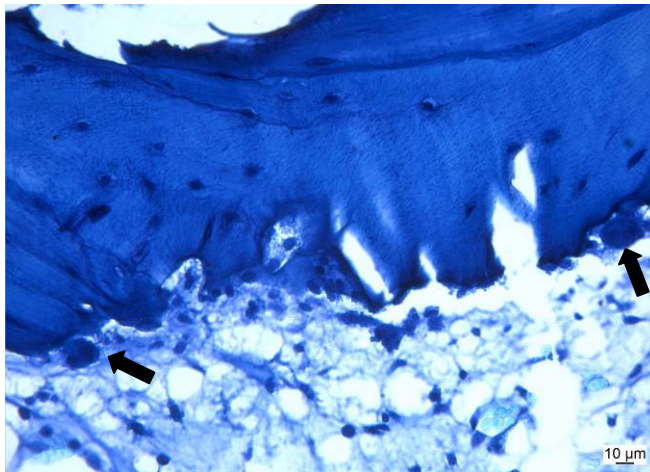
Artefakt-Bildung durch nicht resorbierte
Zementreste
Zone 1-2
Schaf Nr. 806

Abb. 19



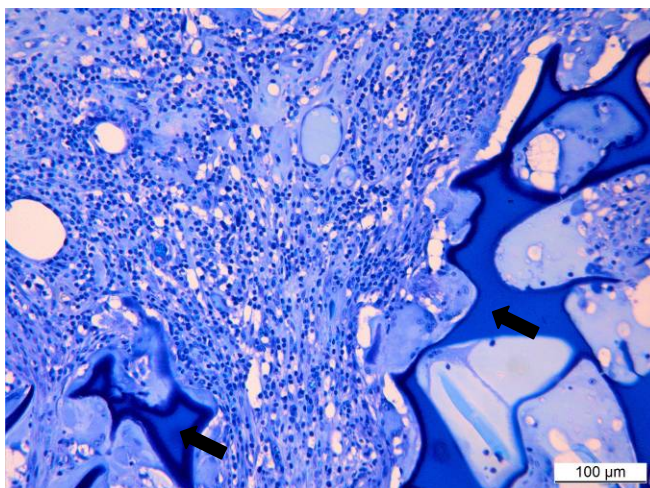
Knochenneubildung (weiße Pfeile)
neben mehrkernigen Riesenzellen
(schwarze Pfeile), Reste der
Seidenmatrix (S)
Zone 1
Schaf Nr. 3102

Abb. 20



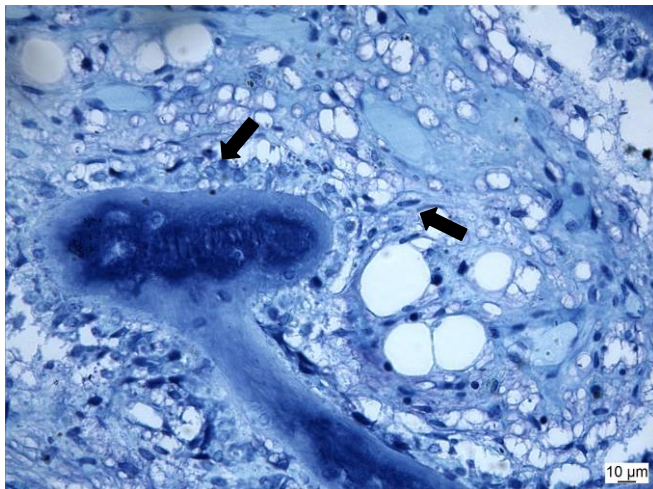
Osteoklasten (Pfeile) an reifem Knochen
gelegen
Zone 4
Schaf Nr. 2503

Abb. 21



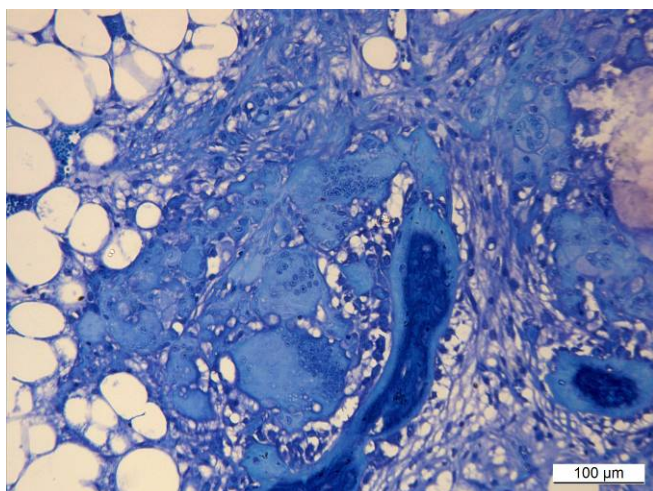
Zahlreiche Lymphozyten und
Plasmazellen, die zirkulär das
Fremdmaterial (Seide, Pfeil) umgeben.
Zone 2
Schaf Nr. 3102.

Abb. 22



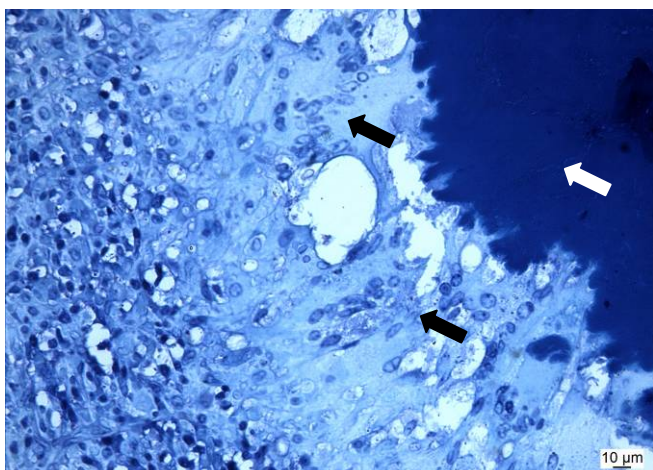
Makrophagen (Pfeile) in Nachbarschaft zu neuem Knochen
Zone 2
Schaf Nr. 2405

Abb. 23



Mehr kernige Riesenzellen in
Nachbarschaft zu neuem Knochen
Zone 2
Schaf Nr. 842

Abb. 24



Zahlreiche mehr kernige Riesenzellen
(schwarze Pfeile) als Saum liegend
um Hydrogel (weißer Pfeil), darum
Saum aus Bindegewebe mit
zahlreichen Lymphozyten.
Zone 2
Schaf Nr. 2407

Danksagung

Besonders herzlich möchte ich mich bei **Dr. Katja Nuss** für die herzliche und kompetente Unterstützung bei der Durchführung und der Korrektur der Arbeit bedanken!

Ein herzliches Dankeschön auch an **Prof. Dr. Brigitte von Rechenberg** für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme in ihre Abteilung.

Vielen Dank auch an **Prof. Dr. Hans Geyer** für die Übernahme des Korreferates.

Herrn **Prof. Dr. A. Fürst**, Direktor der Pferdeklinik der Vetsuisse-Fakultät Zürich, danke ich für die Unterstützung der MSRU.

Allen Mitarbeitern der MSRU, die mir während meiner Aufenthalte in Zürich immer geduldig, freundlich und hilfsbereit entgegen kamen, möchte ich vielmals danken!

Ich danke Herrn **Prof. Dr. von Plocki** und **Dr. E. Linon** für das in mich gesetzte Vertrauen als Kollegin.

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei **Dr. Petra Epple** bedanken, deren Freundschaft und Vorbild in mir die Begeisterung für die Tiermedizin geweckt hat.

Ein ganz besonders herzliches Dankeschön auch an **Manuela Ernst** und **Dr. Monika Menge** eure Freundschaft seit dem Studium ist unendlich viel wert!

Sehr dankbar bin ich auch für die gute und fröhliche Zeit, die wir mit **Steffi Wurst** haben durften und deren Freundschaft und kollegialen Rat wir sehr vermissen.

Für all die Liebe, Hilfe und Unterstützung möchte ich mich von ganzem Herzen bei **meiner Familie** bedanken- es ist ein Privileg, mit vielen Schwestern und Tieren aufzuwachsen!

Meinem Mann **Dr. Michael Reindl** danke ich für seine Liebe, Verständnis und die Geduld mit mir und meiner Tierliebe.

Ich danke **Gott** für unsere Kinder und all das Gute, mit dem wir so reich beschenkt werden!

Lebenslauf

Name	Simone Antje Reindl, geb. Seeck
Geburtsdatum	30. September 1977
Geburtsort	Bruchsal, Deutschland
Nationalität	Deutsch
1984 – 1988	Grund- und Hauptschule Bretten – Diedelsheim, Deutschland
1988 - 1992	Melanchthon-Gymnasium Bretten, Deutschland
1992 - 1995	Schiller-Gymnasium Pforzheim, Deutschland
1995 - 1997	Melanchthon-Gymnasium Bretten, Deutschland
1997	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife, Melanchthon- Gymnasium Bretten, Deutschland
1997 - 1998	Studium der Rechtswissenschaften an der Friedrich-Alexander Universität, Erlangen-Nürnberg, Deutschland
1998 - 2000	Studium der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland
2000 - 2001	Studium der Veterinärmedizin an der Vetsuisse-Fakultät Universität Bern, Schweiz
2001 - 2004	Studium der Veterinärmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen, Deutschland
23.01.2004	Erhalt der Approbation als Tierärztin
2004 – 2008	Angestellte Tierärztin in der Tierklinik Neublach Betriebsgesellschaft mbH, Neublach, Deutschland
seit 2009	Angestellte Tierärztin in der Tierarztpraxis Dr. Linon, Bretten, Deutschland
10/2007 – 1/2012	Anfertigung der Dissertation Wissenschaftliche Betreuung durch Dr. med. vet. Katja Nuss, an der Musculoskeletal Research Unit (MSRU) unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg am Departement für Pferde der Vetsuisse-Fakultät Zürich, Schweiz, Direktor: Prof. Dr. med. vet. Anton Fürst

